

学校编码: 10384

分类号密级

学号: 24520141153500

UDC

厦 门 大 学

硕士学位论文

粪菌移植诱导 HBeAg 持续阳性慢性乙型肝炎患者 HBeAg 血清学阴转

Fecal Microbiota Transplantation Induces HBeAg Clearance
in Patients with Chronic Hepatitis B with Persistent Positive
HBeAg

任艳丹

指导教师姓名: 潘金水 副教授

专 业 名 称: 内科学 (消化系病方向)

论文提交日期: 2017 年 04 月

论文答辩时间: 2017 年 05 月

学位授予日期: 2017 年 月

答辩委员会主席:

评阅人:

2017 年月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年月日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年月日

摘要

背景和目的: 慢性乙型肝炎 (Chronic hepatitis B, CHB) 在世界范围内流行, 且经过长时程口服抗病毒治疗后仅有少数患者能达到停药标准。粪菌移植 (Fecal microbiota Transplantation, FMT) 已被证明可以诱导缓解多种临床疾病, 包括艰难梭菌相关性结肠炎。在本研究中, 我们探索了粪菌移植对长期核苷/酸类似物 (nucleos(t)ide analogues, NAs) 治疗后 HBeAg 仍未实现血清学阴转的 CHB 患者的治疗价值。

实验方法: 在该开放性、单盲、意向性治疗研究中纳入了 18 例经恩替卡韦 (ETV) 或替诺福韦 (TDF) 治疗 3 年以上但仍未实现 HBeAg 消失的慢乙肝患者。这些患者均为经过长达 3 年以上的抗病毒治疗仍未实现 HBeAg 转阴的患者。根据其意愿, 5 位患者愿意接受 FMT 治疗, 被分为 FMT 组。另外 13 位没有接受 FMT 的患者作为该项研究的对照组。FMT 组 5 位患者每 4 周一次经胃镜接受来自匿名健康捐献者的粪菌移植。我们评估了每位患者的 HBeAg 血清学阴转情况, 即既往 HBeAg 阳性者的 HBeAg 消失。在实验开始之前以及每次接受 FMT 治疗的一周后患者都提供了粪便样本以便我们对其进行菌群分析。同时我们收集了患者接受 FMT 之前及其 4 周后的血标本测定 HBeAg 水平。

结果: 实验组其中一位患者因为经济因素在接受 5 次 FMT 治疗后退出了实验, 另四位病人在接受 1 至 7 次 FMT 治疗后实现了 HBeAg 血清学阴转。相比之下, 对照组无一例实现 HBeAg 血清学阴转。未观察到 FMT 相关的严重不良反应。较基线水平相比, FMT 治疗之后收集到的粪便标本展现出更明显的菌群多样性。

结论: 粪菌移植可以诱导长期抗病毒治疗 HBeAg 不能转阴的患者获得 HBeAg 清除, 可能使接受口服抗病毒治疗然而无法停药的 HBeAg 阳性患者受益。

关键词: 慢性乙型肝炎; 粪菌移植; 抗病毒治疗

Abstract

Background and Aims: Chronic hepatitis B (CHB) is a worldwide disease whereas only a small part of patients can achieve the standard of ceasing treatment even after years of oral antiviral therapy. Fecal microbiota transplantation (FMT) has been shown to induce remission in several diseases including *Clostridium difficile*-related colitis. In this study, we investigated the efficacy of FMT on patients with persistent positive HBeAg following a long-term course of nucleos(t)ide analogues (Nas) treatment.

Methods : Eighteen patients were recruited for this open label, single-blind, intention-to-treatment study. Five patients who remained HBeAg-positive following >3 years of antiviral treatment were enrolled in this trial of FMT. These patients received FMT from healthy anonymous donors via upper endoscopy every 4 weeks. Thirteen patients did not receive the FMT and were enrolled as controls. HBeAg clearance, defined as the loss of HBeAg, was assessed for each patient. Patients provided stool samples prior to the study and one week after each FMT for microbiota analysis. Blood samples were collected before FMT and 4 weeks after FMT for HBeAg measurement.

Results : One patient exited the trial after five FMT treatments due to an economic consideration. The other four patients achieved HBeAg clearance after one to seven FMT treatments. In contrast, none of the control patients achieved HBeAg clearance. There were no significant adverse events related to FMT. Compared with the baseline, stool samples from patients collected following FMT had greater microbial diversity.

Conclusion: FMT may induce HBeAg clearance, which otherwise could not be achieved with long-term antiviral therapy, without significant adverse events. HBeAg-positive patients receiving indefinite oral antiviral therapy may benefit from FMT.

Key words: Chronic hepatitis B; fecal microbiota transplantation; antiviral treatment

目录

中文摘要	I
英文摘要	II
第 1 章前言	1
1.1 慢性乙型肝炎相关背景	1
1.1.1 乙型肝炎病毒概述	1
1.1.2 慢性乙型肝炎流行病学和预防	1
1.1.2.1 慢性乙型肝炎流行病学	1
1.1.2.2 慢性乙型肝炎预防	2
1.1.3 慢性乙型肝炎发病机制	3
1.1.4 慢性乙型肝炎治疗现状	3
1.2 粪菌移植相关背景	4
1.2.1 肠道微生态的概念	4
1.2.2 肠道微生态研究方法	6
1.2.2.1 肠道菌群鉴定方法	6
1.2.2.2 宏基因组学和高通量测序	8
1.2.3 粪菌移植研究的历史与进展	9
1.2.4 肠道菌群与慢性乙型肝炎之间的相互作用关系	11
第 2 章材料与amp;方法	15
2.1 试剂、材料及关键仪器	15
2.1.1 主要试剂	15
2.1.2 关键仪器	15
2.2 方法	16
2.2.1 研究设计	16
2.2.2 受研究人群	16
2.2.3 基线评估	17
2.2.4 干预措施和后续检查	18
2.2.4.1 供体筛选	18

2.2.4.2 粪菌的分离纯化.....	18
2.2.4.3 粪菌移植入患者肠道.....	19
2.2.5 乙肝病毒标志物检测和临床指标.....	20
2.2.5.1 Elisa 法测定 HBV e 抗体.....	20
2.2.5.2 Elisa 法测定 HBV e 抗原.....	22
2.2.5.3 PCR-荧光探针法测定 HBV DNA.....	23
2.2.5.4 速率法检测血标本中谷丙转氨酶 (ALT) 浓度.....	27
2.2.6 肠道菌群的评估和分析.....	29
2.2.7 统计分析.....	32
第 3 章结果及分析.....	33
3.1 病人人口统计学, 临床特点, 实验终点.....	33
3.2 供体.....	36
3.3 患者的临床治疗效果.....	36
3.4 FMT 组供体和受体的肠道微生态分析.....	40
第 4 章讨论.....	42
参考文献.....	44
英文缩略词表.....	50
致谢.....	51
附件材料.....	52
研究生期间发表的学术论文.....	60

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Relevant backgrounds of chronic hepatitis B	1
1.1.1 Summary of the hepatitis B virus.....	1
1.1.2 Epidemiology and prevention of chronic hepatitis B	1
1.1.2.1 Epidemiology of chronic hepatitis B	1
1.1.2.2 Prevention of chronic hepatitis B.....	2
1.1.3 Pathogenesis of chronic hepatitis B	3
1.1.2 Current state of antiviral therapy of hepatitis B.....	3
1.2 Relevant backgrounds of fecal microbiota transplantation (FMT)	4
1.2.1 Concept of gut microbiome	4
1.2.2 Research approaches of gut microbiome	6
1.2.2.1 Intestinal flora identification method.....	6
1.2.2.2 Metagenomics and high-throughput sequencing	8
1.2.3 The course and advances of the study of fecal microbiota transplantation ..	9
1.2.4 The interactions between gut microbiome and chronic hepatitis B.....	11
Chapter 2 Materials and Methods	15
2.1 Reagents , materials and main instruments	15
2.1.1 Key reagents.....	15
2.1.2 Main instruments	15
2.2 Methods	16
2.2.1 Study Design.....	16
2.2.2 Study Population.....	16
2.2.3 Baseline Assessments	17
2.2.4 Interventions and Follow-Up Examinations	18
2.2.4.1 Donor selection	18

2.2.4.2 Separation and purification of fecal microbiota.....	18
2.2.4.3 Procedure of transplanting fecal microbiota into gut.....	19
2.2.5 Assessment of HBV Markers and Clinical Outcomes.....	20
2.2.5.1 Quantitative determination of HbeAb through the method of Elisa	20
2.2.5.2 Quantitative determination of HbeAg through the method of Elisa	22
2.2.5.3 Quantitative determination of HBV DNA by PCR-fluorescence probe method.....	23
2.2.5.4 Quantitative determination of serum glutamic-pyruvic transaminase with rate method	27
2.2.6 Assessment and Analysis of the Microbiota.....	29
2.2.7 Statistical Analysis.....	32
Chapter 3 Experimental results and Analysis	33
3.1 Patient Demography, Clinical Characteristics, and Termination of the Trial.....	33
3.2 Donors	36
3.3 Clinical Outcome of the Patients	36
3.4 Gut Microbiota of FMT Donors and Recipients.....	40
Chapter 4 Discussion	42
References	44
English abbreviations	50
Acknowledgement.....	51
Appendices.....	52
Academic papers published during the graduate.....	60

第 1 章前言

1.1 慢性乙型肝炎相关背景

1.1.1 乙型肝炎病毒概述

乙型肝炎病毒（hepatitis B virus, HBV）是一种部分双链 DNA 病毒，为嗜肝病毒科（Hepadnavirus）正嗜肝 DNA 病毒属（Orthohepadnavirus）的一员，可引起急、慢性病毒性肝炎。乙型肝炎表面抗原（hepatitis B surface antigen, HBsAg）在 1972 年被世界卫生组织（WHO）正式命名。在此之前经历了澳大利亚抗原、肝炎相关抗原（hepatitis associated antigen, HAA）等多个认识阶段。其在 1965 年被 Blumberg 等首次发现，至 1967 年 Krugman 将其与肝炎联系在一起。直至 1970 年其完整颗粒在电镜下得以呈现，以发现者名字命名为 Dane 颗粒。1979 年 Galibert 测定了 HBV 全基因组序列。

HBV 基因组为环状双链 DNA，全长 3182bp，其负链（长链）有 4 个主要开放性读码框（Open reading frame, ORF）：S 基因区、C 基因区、P 基因区和 X 基因区。S 基因区编码前 S1 蛋白，前 S2 蛋白和 S 蛋白。三者组成的融合蛋白称为大表面抗原（L-HBsAg），由前 S2 和 S 蛋白组成的融合蛋白称为中表面抗原（M-HBsAg），单纯 S 蛋白即小表面抗原（S-HBsAg）。C 基因区由前 C 基因和 C 基因组成。C 基因编码核心蛋白（即 HBcAg），前 C 基因和 C 基因共同编码乙型肝炎 e 抗原（HBeAg）前体蛋白，在内质网中经水解形成 HBeAg。前 C 基因突变可致 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎（chronic hepatitis B, CHB），尽管抗-HBe 阳性，但 HBV 往往仍在复制，并具有传染性。

1.1.2 慢性乙型肝炎流行病学和预防

1.1.2.1 慢性乙型肝炎流行病学

慢性乙型病毒性肝炎（Chronic hepatitis B, CHB）是由乙型肝炎病毒（HBV）持续感染引起的肝脏慢性坏死性炎性疾病，一般为散发，无明显季节性。CHB 呈世界性流行，但流行程度地区差异性很大。2005 年 WHO 流行病学调查及相关研究显示，全球曾感染过 HBV 的人数约 20 亿，世界范围内罹患 CHB 人数大约

在 3.5 至 4 亿之间^[1]，其中 75%在亚洲，我国有 HBV 携带者约 1.2 亿，约占全球总量的 1/3，慢性感染者约 3000 万。

慢性乙型肝炎作为一种损害肝脏的病毒感染，可造成慢性肝脏疾患，导致病人日后罹患肝硬化、肝衰竭以及肝细胞癌的风险显著增加。慢性感染 HBV 的儿童成年后，约 25%会因病程进展死于肝硬化或肝癌。对一项 684 例 CHB 的前瞻性研究表明，CHB 患者发展为肝硬化的估计年发生率为 2.1%^[2]。由于 HBV 感染发展成肝衰竭、肝硬化和原发性肝癌（HCC）而死亡的人数每年约有 100 万^[3]。由 HBV 感染引起的肝硬化在全球和我国的比例分别为 30%和 60%。由 HBV 感染引起的肝细胞癌在全球和我国的比例分别为 45%和 80%^[4-6]。病毒载量高，HBeAg 持续阳性、ALT 水平高或反复波动、合并其他肝炎病毒感染等均属于发生肝硬化的高危因素^[7]。

HBV 主要通过血清、母婴、日常密切接触（如托幼机构儿童和儿童之间密切接触传播）及性接触传播^[8]。除输血引起的 HBV 感染外，如修足、文身、共用牙刷和刮胡刀等也可能经微量血液传播乙肝病毒^[9]。所谓“日常密切接触”类似于性传播，可能是因微小创伤所致的一种特殊经血传播方式，而非呼吸道和消化道传播。母婴传播主要发生在围生期，大部分在分娩过程中感染，也有小部分可能系宫内感染，母亲为 HBsAg/HBeAg 阳性的婴儿，感染率高达 95%。随着乙型肝炎疫苗联合乙型肝炎免疫球蛋白（HBIG）的应用，母婴传播已明显减少^[9]。因研究发现蚊子叮咬时吸血与注入的结构互不相通，且未发现流行病学证据，故已排除昆虫传播途径^[8]。

1.1.2.2 慢性乙型肝炎预防

HBV 携带者的广泛存在加大了控制传染源的难度，因此预防主要通过切断传播途径，如避免通过血液和体液传播，包括注射器、针头等每人单用或高压蒸汽消毒或煮沸 20 分钟、食具和洗漱刮面用具专用等具体措施。就目前的医疗手段来说，预防 HBV 感染最有效的方法是接种乙型肝炎疫苗。已广泛应用的是基因工程疫苗，全程需接种 3 针，一般按照 0、1 和 6 个月方案，每次 5~20 μg ，免疫效果显著，儿童优于成人。如接种数年后抗-HBs 小于 10mIU/mL，应加强接种一次。对于即将暴露者或者意外暴露的高危人群，应选择被动免疫——乙型肝炎免疫球蛋白（HBIG）注射，保护作用发挥迅速。

1.1.3 慢性乙型肝炎发病机制

乙型肝炎的发病机制极为复杂，迄今尚未完全明了。肝细胞病变主要取决于机体的免疫应答，尤其是细胞免疫应答。免疫应答既可清除病毒，同时亦可导致肝细胞损伤，甚至诱导病毒变异。机体免疫反应不同，临床表现也各不相同。过去认为当机体处于免疫耐受状态，如免疫系统尚未成熟的小儿在围生期获得 HBV 感染，不引发免疫应答，往往成为无症状携带者，但目前认为实际上是能透过胎盘的病毒蛋白 (HBeAg) 所诱导的 Th 细胞及细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 无应答所致；当机体免疫功能正常时，通常表现为急性肝炎经过，例如感染 HBV 的成年人，大部分都可彻底清除 HBV 而痊愈；而当机体免疫反应不足，或反应不当（包括不完全免疫耐受、自身免疫反应产生、HBV 基因突变逃避免疫清除等情况），可导致慢性肝炎；当机体处于变态反应，大量抗原-抗体复合物产生并激活补体系统，以及在肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、白细胞介素-1 (interleukine-1, IL-1)、IL-6、趋化因子、细胞间黏附分子 (ICAM-1)、内毒素等参与下，导致大片肝细胞坏死，发生重型肝炎。

1.1.4 慢性乙型肝炎治疗现状

慢性乙型肝炎治疗直接目标在于通过抑制病毒复制，降低炎症反应，改善肝功能。远期目标是延缓和减少肝炎发作和肝硬化、肝功能衰竭、肝癌，提高存活率，改善生活质量和延长生存时间。CHB 的临床治愈标准是停止治疗后持续的病毒学应答、HBsAg 消失或伴有抗-HBsAg 阳转、并伴有 ALT 复常和肝脏组织病变改善。

血清 HBsAg 在疾病早期出现，其阳性是 HBV 感染的重要依据。但不能反映 HBV 复制情况及预后。血清抗-HBsAg 的出现，是 HBV 感染恢复的标志。HBV 复制时 HBeAg 可分布在肝细胞的胞质和包膜。未行抗 HBV 治疗时，血清 HBeAg 阳性提示 HBV 复制活跃，在感染早期即可出现，是肝炎传染性强的标志。抗-HBe 阳性时考虑两种情况：一是抗病毒治疗或机体产生了对 HBV 的免疫清除作用，表示 HBV 复制减弱，传染性降低；二是系前 C 基因变异所致，则仍常见 HBV 复制，并有传染性，是 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎的主要组成部分。血清 HBV DNA 是 HBV 复制和传染性的直接标志。

HBsAg 的转阴及抗-HBsAg 的出现一直被认为是 HBV 清除和临床痊愈的标

志。在慢性 HBV 感染者血清中，HBV DNA 可持续阳性。目前，治疗慢性乙型肝炎的主要用药方案包括干扰素（Interferon, IFN）/聚乙二醇干扰素（Pegylated interferon, Peg-IFN），以及以恩替卡韦（Entecavir, ETV）、替诺福韦（Tenofovir, TDF）和替比夫定（Telbivudine, LdT）为代表的核苷（酸）类似物（nucleos(t)ide analogues, NAs）。相比之下，TDF 和 ETV 抑制病毒效力最强，耐药率最低，因而这两者目前在临床上被指定为首选的 NAs，作为一线治疗药物^[1, 7, 8, 10, 11]。对于 HBeAg 阳性的慢性乙型肝炎患者而言，实现 HBeAg 血清学转换是终止抗病毒治疗的先决条件^[1, 7, 8, 10, 11]。一般来说，HBeAg 血清学转换在 HBeAg 血清学阴转之后才会出现。不幸的是，现阶段抗病毒治疗 1 年后的 HBeAg 血清学转换率仍不理想，使用 Peg-IFN 和使用 ETV 的血清学转换率分别只有 29-36%^[12, 13]和 21%^[14]。ETV 治疗 5 年后，HBeAg 血清学转化率小幅度提升至 23%^[15]。类似地，TDF 治疗 48 周时，HBeAg 阳性 CHB 患者中，HBeAg 血清学转换率为 21%^[16]，若治疗延长至 5 年，比例可提升至 29.9%^[17]。从中可以看出，无论是 ETV 还是 TDF，经过数年抗病毒治疗后只有很小一部分患者能够实现 HBeAg 血清学阴转和血清学转换。而且，如果治疗一年内无法实现 HBeAg 血清学阴转或血清学转换而继续延长抗病毒疗程，获得额外 HBeAg 血清学阴转或血清学转换机会很低。

因而，促进经过长时程口服抗病毒治疗然而 HBeAg 持续阳性的 CHB 患者获得 HBeAg 血清学阴转或血清学转换，在 CHB 进展至终末期之前进行有限疗程干预治疗显得尤为重要。倘若没有，那么口服抗病毒的疗程可能将没有终点。

1.2 粪菌移植相关背景

1.2.1 肠道微生态的概念

肠道微生态可被视做人体隐形的“第八大器官”，在人体的营养、代谢、免疫等诸多方面发挥重要作用。正常状态下，细菌、古生菌和真菌共同构成人体的肠道菌群，依靠目前的生物科技手段几乎无法实现对这些肠道微生物的体外培养。根据我国 BGI 基因公司对肠道微生物宏基因组的测序结果可知，人体内肠道微生物的基因数目乃人类基因的 150 倍，细菌数目是宿主自身细胞数量的 10 倍，占有所有基因的 99%以上^[18]。据推测，人体肠道微生物的平均总重量可达 1 至 1.5 千克，几乎等同于人体重要消化器官——肝脏的重量。人类宏基因组计划 2010

年的研究成果表明,共发现有近 5000 种细菌,新发现的菌种占其中 78%,但对其各自作用的研究还比较局限,对菌种变异所知甚少。由于小肠 pH 值略为偏碱性,含有消化酶,并且小肠运动激烈,肠液流量大,因而大多数肠道细菌定殖于结肠,回肠、空肠和十二指肠内细菌数量大幅度递减,且各部位优势菌群的种类也有所不同,从十二指肠、空肠、回肠、盲肠到结直肠,需氧菌逐渐减少,厌氧菌逐步增加从盲肠部位开始代替需氧菌成为优势菌^[19, 20]。其中大部分是与宿主共生的生理性细菌,少数为与宿主共栖的条件致病菌及病原菌。人体健康状态下,肠道微生物生态系统的多样性和稳定性的维护依赖于肠道微生物各种反馈作用机制的调控。研究发现,相比于人体其他部位(如皮肤、口腔),肠道菌群的构成能长期保持相对稳定,而非持续不断变动。肠道菌群的多样性受遗传、饮食习惯、年龄、运动、地域环境、宿主精神状态和抗生素使用等因素的影响,当肠道细菌的多样性下降会破坏菌群的稳定性。

依据细菌和人体的相互作用关系,我们将肠道菌群划分为三大类:①与宿主共生的生理性菌群,或称为共生菌、有益菌,如双歧杆菌、类杆菌、优杆菌、消化球菌、乳杆菌等,其附着于深层黏膜上皮细胞,多为专性厌氧菌,同时也是占菌群总数量 99%以上的肠道菌群主要构成者,具有营养及免疫调节的作用,对机体有益无害;②与宿主共栖的条件致病菌,或称为中间菌。以兼性需氧菌为主,为肠道的非优势菌群(如肠球菌、肠杆菌等),在人体肠道微生态平衡时无害,当稳态被破坏时这些细菌在特定条件下表现出侵袭性,对人体有害;③病原菌,或称有害菌,大多为过路菌(变形杆菌、假单胞菌和韦氏梭菌等)。肠道微生态平衡时,这些细菌长期定殖的机会少、扩增数量少且不会致病,如肠内外环境改变导致肠道优势菌群失势,进而引起肠道菌群失调,过路菌或条件致病菌数量超出正常水平可导致人体发病^[21-23]。

人体肠道中种类繁多的细菌分布在肠腔的不同部位,概括来说,由浅及深形成三个生物层面:肠球菌、大肠杆菌等好氧和兼性好氧菌分布在肠腔的表层,可游动,称为腔菌群;粪杆菌、消化链球菌和优杆菌等厌氧菌分布在中层;而最具生理意义的双歧杆菌和乳酸杆菌空间分布最深,紧贴粘膜表面,并与粘膜上皮细胞粘连形成细菌生物膜,属于膜菌群。

2011 年 Arumugam 等^[24]分析了来自 4 个国家 22 位欧洲人的粪菌宏基因组测

序结果，测定的序列绝大部分来自于细菌——判为人为因素污染的部分仅占 0.14%，其余所有真核细胞的序列只占 0.5%，古生菌和病毒的比例分别为 0.8% 和 5.8%。与之前公布的数据库对比，遂将人类肠道微生物宏基因组分为以拟杆菌属(*Bacteroides*)、普里沃菌属(*Prevotella*)和瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)为代表的 3 个肠型 (文中命名为“enterotypes”)，并指出这三种肠型在各大洲各国家普遍存在。该课题组还大胆推测，人体肠道中存在有限的几种“人体-菌群”和谐共生的平衡状态，并随宿主饮食和用药状态而发生不同变化。人体肠道中的细菌不仅需要适应宿主机体状态，同时要与其他种类的细菌竞争繁衍，以致机体呈现出有些菌种处于高丰度状态，但有些对人体提供特殊保护作用的菌种如产甲烷菌则呈低丰度状态的稳态。出乎我们意料的是，相关实验证实肠道菌群高度丰富的功能往往取决于一些低丰度的细菌。以低丰度的埃希氏杆菌属为例，与细菌菌毛 (bacterial pilus) 装配相关的两种丰富的蛋白质，FimA (COG3539) 和 PapC (COG3188)，90%以上是由该菌属参与合成的。菌毛，赋予微生物能够定殖在宿主特定器官上皮组织的能力；通过与宿主肠道表面结构的甘露糖和人体黏液结合从而帮助肠道微生物在人类消化道停留更长的时间。此外，这两种蛋白在细菌接合转移质粒的过程中发挥关键作用，通常涉及抗生素耐药性等保护性功能的交换。由此可知，菌毛为低丰度肠道菌在肠道中生存和维持丰度提供了相当大的益处。这个例子说明，人体肠道微生态中数量上占优势的种属无法代表肠道菌群整体的功能复杂性。肠道菌群的功能不仅包括将结构相对复杂的碳水化合物降解为更容易被机体吸收的酶作用底物，还包括为人体提供大量维生素。虽然 3 种肠型均囊括了所有维生素代谢途径，但拟杆菌属和普里沃菌属重点合成的维生素有所不同：前者合成的维生素富含生物素、核黄素、泛酸和抗坏血酸，而后者为硫胺素和叶酸^[24]。不同肠型之间不同的系统发育和功能引发研究者推断，不同生物营养链的组合使菌群与人类宿主和谐共处。

1.2.2 肠道微生态研究方法

1.2.2.1 肠道菌群鉴定方法

(1) 以往肠道微生态研究中用来分析菌群的经典方法准确性不高，操作过程繁琐，包括依赖和不依赖培养过程的两大类技术。

依赖于培养过程的传统技术，是将从肠道分离的微生物进行培养、再分离，

再对得到的分离物进行表型特征性状的测定和鉴定。对某一类特定的细菌的计数一般来说需要在添加了选择性物质的特定培养基上进行,而添加的物质可能对肠道细菌具有某种程度的抑制性,因此会导致计数结果略低于实际值。例如,常用作双歧杆菌分析计数的培养基有 YN-6、BIM-25 培养基等,这些培养基中添加的选择性试剂主要包括卡拉霉素等抗生素或丙酸。迄今为止关于肠道菌群的一大部分知识都是研究者通过这种技术获得的。

不需要培养过程的鉴定方法,即利用传统的显微镜分析技术和酶/代谢产物分析法获得样本中微生物的实际数量的直接依据。前者涉及加热固定以及染色等步骤,并非所有的细菌都会着色,所得数据也许严重低于真实值。后者通过测定样品中某些特异性的酶或代谢产物的含量,反推计算得到对应微生物的量。比如,通过测定粪便样本中 β -葡萄糖醛酸苷酶的活性来判定肠道内双歧杆菌的数量。不过到目前为止,还难以将某种特定的酶活性与肠道中某类微生物类群建立准确的一一对应关系,这也是该方法的局限性。

(2) 鉴于传统方法分析鉴定肠道菌群组成和分布情况所表现出的显著局限性,随着分子生物学的发展,新技术不断涌现,对肠道菌种的鉴定能力大幅度提高,对研究其生物多样性有重要意义。常用的新技术包括:16S rRNA 基因的序列分析、原位分析法(In Situ)、随机扩增多态性技术(random amplified polymorphic DNA, AP-PCR)、16S rRNA 基因的限制性片段长度多态性分析(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)、变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)、单一 rRNA 基因测序、探针芯片杂交等。下面简要介绍一下 16S rRNA 基因的序列分析法和 16S rRNA 基因的限制性片段长度多态性分析。

Woses 率先提出利用 16S rRNA 基因的序列分析方法对细菌进行分类并研究不同菌种间的进化关系,该方法是基于 16S rRNA 的基因序列高度保守并且其核苷酸位点的变化表现出种的特异性^[25]。实施的基本步骤是:首先通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增 16S rRNA 序列,然后将反应所得的扩增产物送测序并利用测序结果分析软件解读数据,经校正后的正、反链序列可组合成一个一致序列,最后将这个序列中的特征性序列和已知某菌属的特征性序列对比,即可得到鉴定结果,也可以从计算机数据库中搜索 DNA 序列相似

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库