

# 读书报告

- 汇报人：吴胜奎
- 时间2018.10.28



[Front Microbiol.](#) 2018; 9: 1124.

Published online 2018 May 29. doi: [10.3389/fmicb.2018.01124](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01124)

PMCID: PMC5987169

PMID: [29896183](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29896183/)

## The Presence or Absence of Intestinal Microbiota Affects Lipid Deposition and Related Genes Expression in Zebrafish (*Danio rerio*)

[Yi Sheng](#)<sup>1</sup>, [Hui Ren](#)<sup>1</sup>, [Samwel M. Limbu](#)<sup>1,2</sup>, [Yuhong Sun](#)<sup>1</sup>, [Fang Qiao](#)<sup>1</sup>, [Wanying Zhai](#)<sup>3</sup>, [Zhen-Yu Du](#)<sup>1</sup> and [Meiling Zhang](#)<sup>1,\*</sup>

[Author information](#) ▶ [Article notes](#) ▶ [Copyright and License information](#) ▶ [Disclaimer](#)

**IF=4.019**

# 目录

## CONTENTS

01 研究背景

02 材料方法

03 结果分析

04 讨 论

05 总 结

# 01

## 研究背景

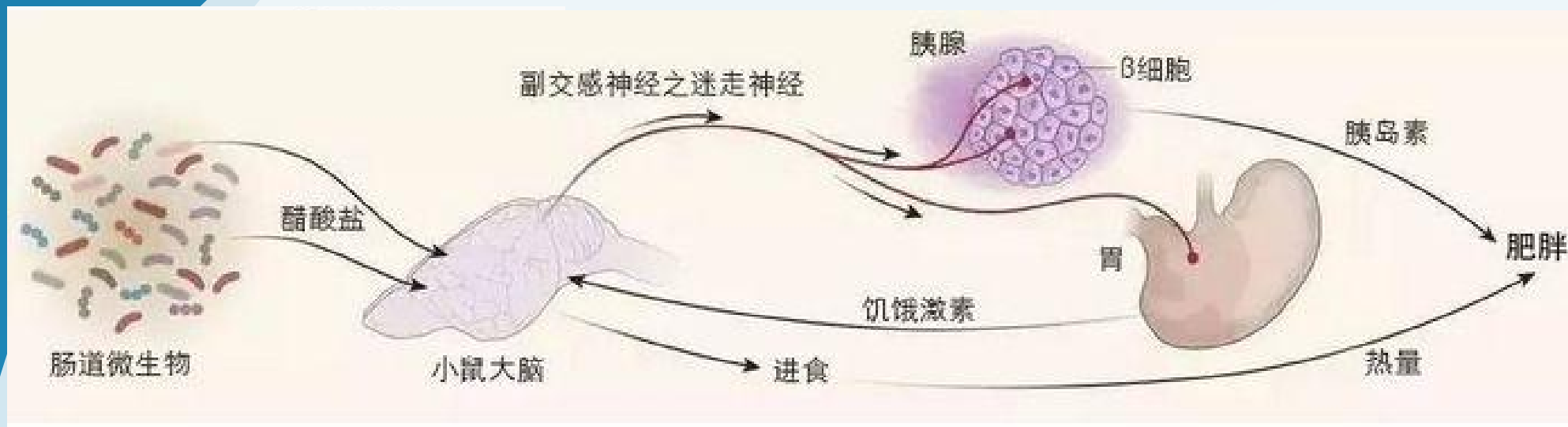
# 01 研究背景

肠道是动物体的主要吸收器官，被称为微生物群落的微生物细胞密集定殖区。微生物群落被认为是宿主中的代谢“器官”其发酵难消化的膳食多糖增加脂肪细胞中的脂质积累。并影响营养吸收和能量平衡。



# 01 研究背景

三酰基甘油酯 (TAG) 是动物的主要能量来源，但肠道微生物群对宿主脂质代谢的潜在影响尚未得到彻底研究。越来越多的证据表明肠道微生物群与脂质代谢之间存在密切关系。例如，从肥胖人体肠道中分离的细菌与高脂肪饮食 (HFD) 相结合诱导无菌小鼠肥胖和胰岛素抵抗，这也可能是由脂多糖 (LPS) 引起的。所有这些发现表明肠道微生物群参与宿主脂质代谢。



在小鼠的研究中已经表明肠道微生物群参与宿主脂质代谢。确定肠道微生物群的作用主要限于哺乳动物，占脊椎动物总体多样性的不到10%。斑马鱼已被用于探索微生物群落在免疫系统调节，发育和营养获取中的作用。除了遗传和基因组资源外，斑马鱼还有许多优于哺乳动物的优势，包括高繁殖率，快速外部发育和光学透明度。因此，斑马鱼是用于分析肠道微生物群和宿主生理学的合适模型动物



无菌动物模型已成功用于鉴定肠道微生物群在哺乳动物中的作用。然而，使用无菌斑马鱼研究营养机制仍然存在许多缺陷。例如，无菌斑马鱼的寿命太短，不适合营养分析，因此不容易识别不同器官的表型和代谢特征。抗生素治疗通常会耗尽肠道微生物群。因此，抗生素治疗的动物是另一种探索共生微生物群功能的流行模型。通过使用抗生素处理的动物来检测共生细菌在肝脏或肠中的影响并识别潜在的分子机制是方便的。然而，抗生素诱导的影响可以通过微生物群的消耗，抗生素对宿主的直接影响或剩余抗生素抗性细菌的影响来解释。



# 实验流程

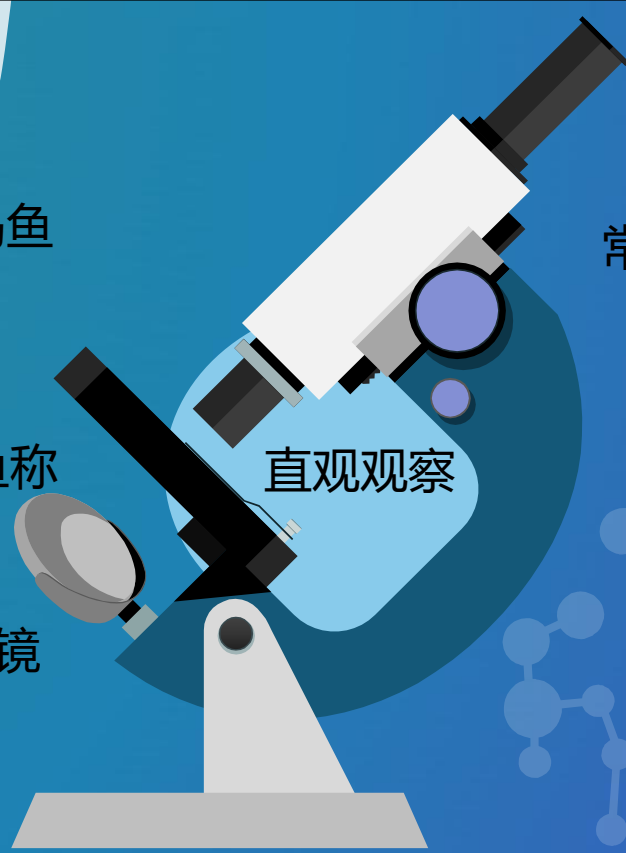
无菌斑马鱼

常规斑马鱼

用无菌蛋黄孵育3小时

两个处理中的6尾斑马鱼称重匀浆，涂板，计数

样品制备，切片，染色，电镜观察



直观观察

常规斑马鱼

抗生素处理斑马鱼

三种不同浓度的混合抗生素

按体重的4%，喂食3天，2/d

样品制备，切片，油红染色，显微镜观察



# 分子水平的研究



01

RNA提取和Illumina  
RNA-Seq

02

cDNA用于文库构建  
测出差异表达的基因

03

qRT-PCR

02

材料方法

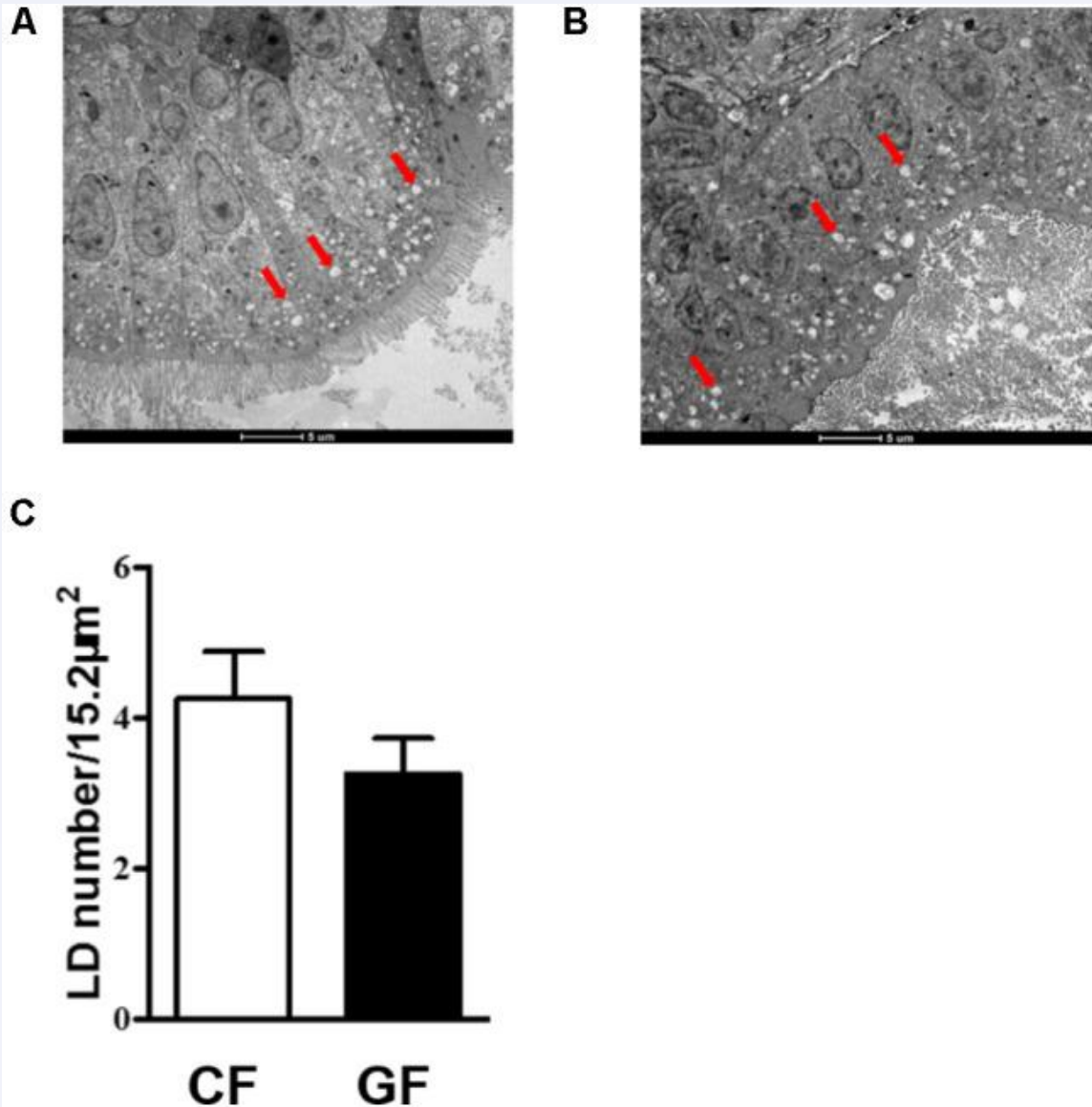
# 材料方法



# 03

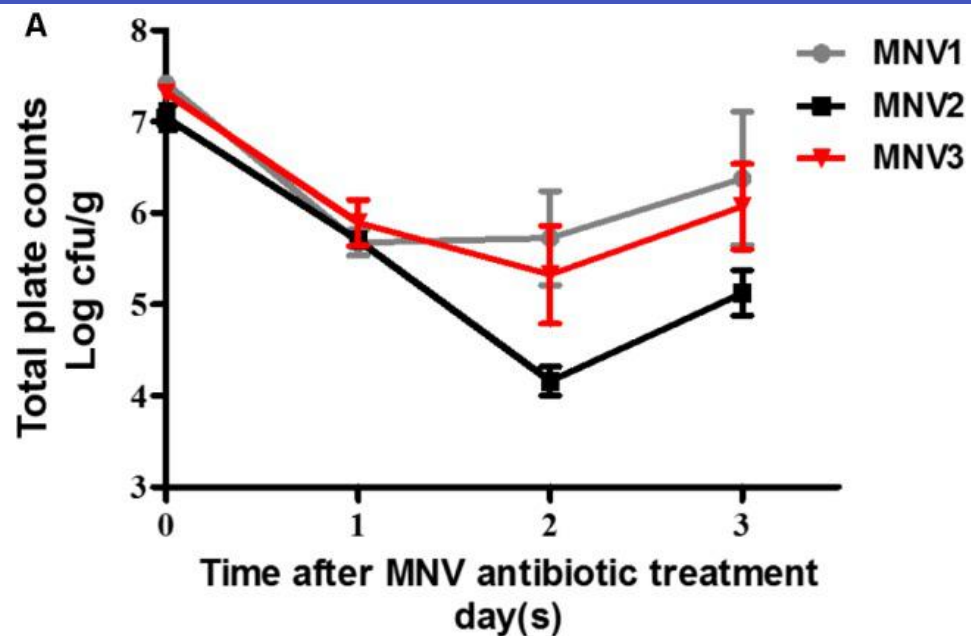
## 结果分析

### 03 肠道微生物群对无菌斑马鱼脂质吸收的影响

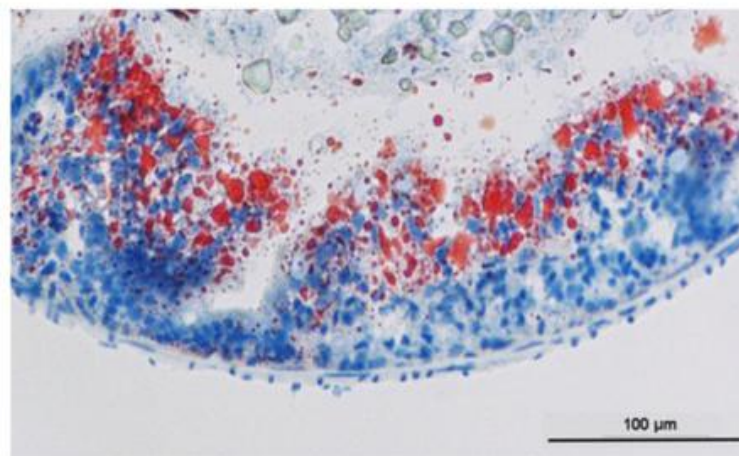


常规斑马鱼饲喂蛋黄的肠上皮脂滴 (LD) 的TEM图像 (A)  
无菌斑马鱼喂蛋黄 (B)  
LD的在15.2微米的数量2计算肠上皮 (C)。  
通过Student's t检验确定显著差异

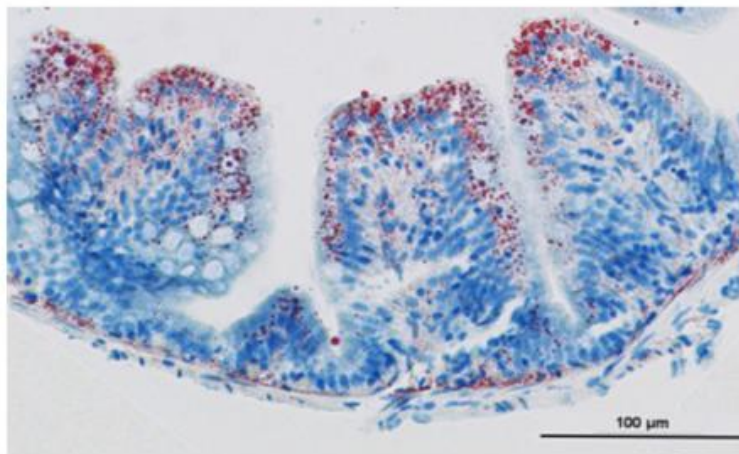
# 03 抗生素治疗对脂质沉积代谢的影响



**B**



**C**



(A) 用不同浓度的  
抗生素处理3天改变  
细菌数量。  
对照 (B)  
和抗生素治疗组 (C)  
中脂质积累的油染色。

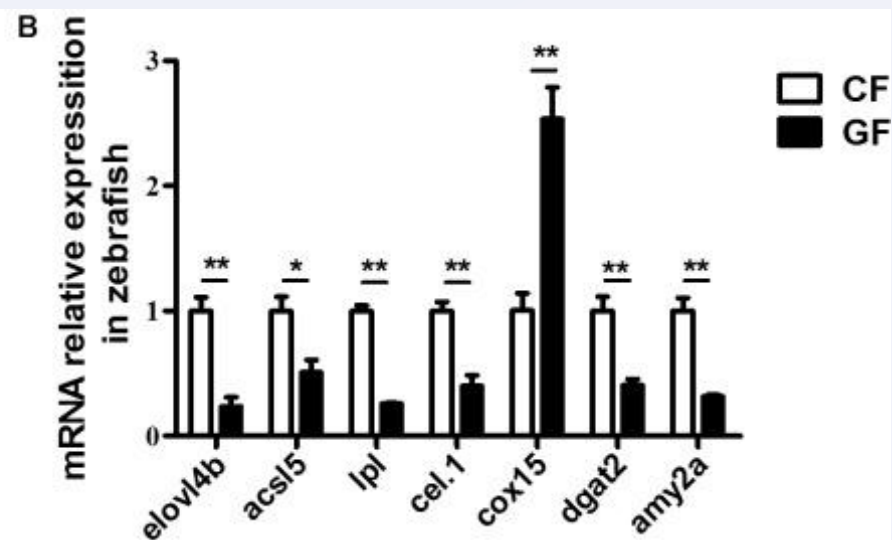
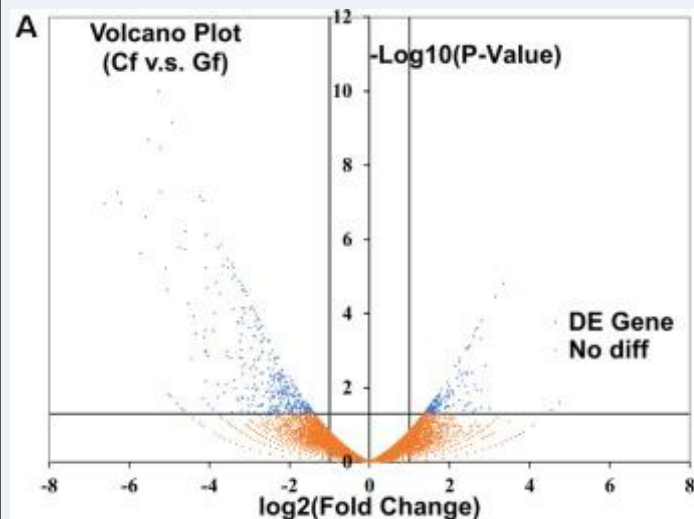
# 03 抗生素处理的斑马鱼的饲料配比

## Formulation and nutrition composition of experimental diet

Component (g/kg)	Diet
Casein	360
Gelation	80
Corn starch	324.65
Soybean oil	120
Mixed vitamin <sup>1</sup>	10
Mixed minerals <sup>2</sup>	40
Carboxy methyl cellulose (CMC)	30
Cellulose	28.6
Choline chloride	5
Butylated hydroxytoluene (BHT)	0.25
	1.50
Total(g)	1000
Total fat(%)	12
Total protein(%)	44

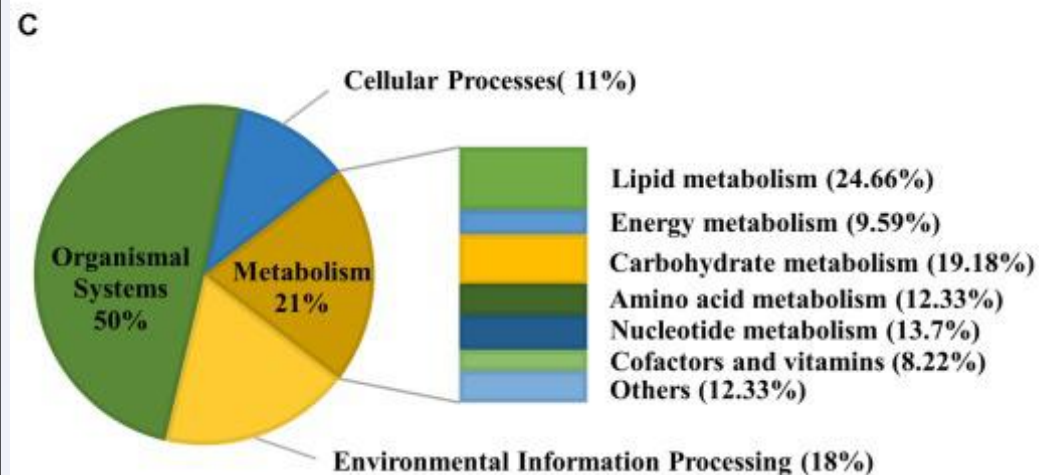
mixed vitamin , (mg or IU/kg): 500,000 I.U. (international units)  
 Vitamin A, 50,000 I.U. VitaminD3, 2500 mg Vitamin E, 1000 mg  
 Vitamin K3, 5000 mg Vitamin B1, 5000 mg Vitamin B2, 5000 mg  
 Vitamin B6, 5000 µg Vitamin B12, 25,000 mg Inositol, 10,000  
 mg Pantothenic acid, 100,000 mg Cholin, 25,000 mg Niacin, 1000  
 mg Folic acid, 250 mg Biotin 10,000 mg Vitamin C  
<sup>2</sup> mixed minerals, (g/kg): 314.0 g CaCO<sub>3</sub>, 469.3g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,  
 147.4 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 49.8 g NaCl, 10.9 g Fe(II)gluconate,  
 3.12 g MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 4.67 g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.62 g CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O,  
 0.16 g KJ, 0.08 g CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.06 g NH<sub>4</sub> molybdate, 0.02 g  
 NaSeO<sub>3</sub>

# 03常规和无菌斑马鱼的DEGs



(A) 来自CF和GF的转录组的差异表达基因 (DEG) 的火山图。

(B) 结果证实了RNA-Seq的有效性, 表明*elovl4b*, *acsl5*, *lpl*, *cel.1*, *dgat2*, *amy2a*, *gpat2*, *cd36*和*apoa4*的表达显著下降, 而*cox15*在GF中显著增加。



(C) 不同表达基因的分布与营养代谢有关, 包括脂质代谢, 碳水化合物代谢, 核苷酸代谢, 氨基酸代谢, 能量代谢, 辅因子和维生素等氨基酸代谢。



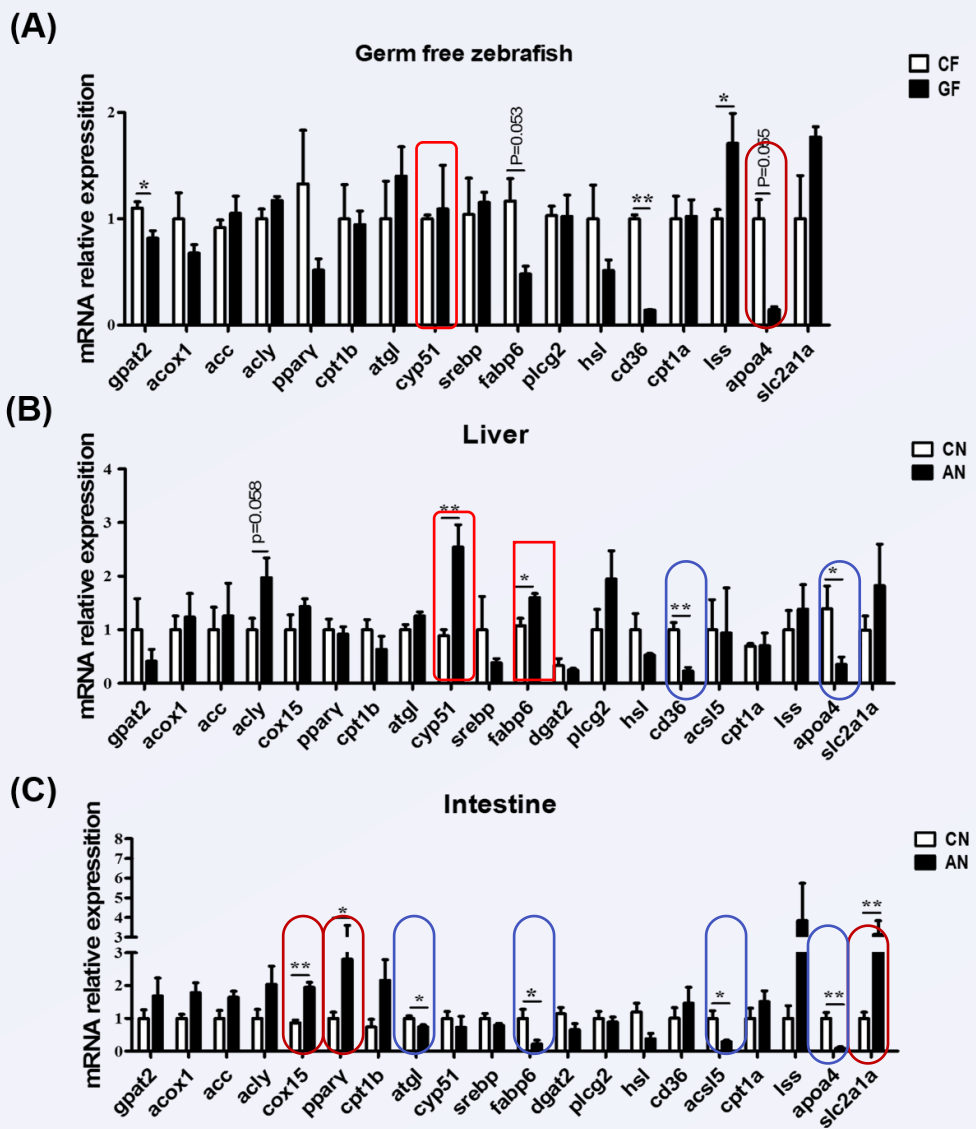
# 03 在两种模型中响应细菌存在的基因

Comparison of expression patterns observed with two models.

Gene <sup>b</sup>	CF/GF <sup>a</sup>		CN/AN <sup>a</sup>			
	Fold change <sup>c</sup>	p-value	Liver		Intestine	
			Fold change <sup>c</sup>	p-value	Fold change <sup>c</sup>	p-value
<i>apoa4</i>	4.80	0.055	3.91	0.037*	10.72	0.003**
<i>hsl</i>	1.95	0.207	1.56	0.218	2.64	0.067
<i>dgat2</i>	2.46	0.009**	1.32	0.327	1.54	0.352
<i>slc2a1a</i>	0.57	0.176	0.54	0.207	0.40	0.009**
<i>lss</i>	0.59	0.04*	0.72	0.635	0.46	0.233
<i>cox15</i>	0.4	0.001**	0.7	0.182	0.51	0.001**
<i>fabp6</i>	2.43	0.053	0.62	0.015*	4.60	0.046*
<i>acsl5</i>	1.96	0.016*	1.06	0.132	3.46	0.012*
<i>cd36</i>	7.09	0.001**	4.40	0.007**	0.69	0.204
<i>gpat2</i>	1.22	0.023*	2.42	0.305	0.60	0.274
<i>ppary</i>	1.54	0.236	1.09	0.771	0.35	0.03*
<i>acox1</i>	1.48	0.4	0.81	0.664	0.56	0.077
<i>cpt1b</i>	1.06	0.892	1.57	0.294	0.46	0.079
<i>plcg2</i>	1.01	0.968	0.51	0.093	1.13	0.699
<i>cpt1a</i>	0.98	0.936	0.82	0.752	0.66	0.866
<i>cyp51</i>	0.92	0.834	0.35	0.009**	1.37	0.49
<i>srebp</i>	0.90	0.408	2.62	0.302	1.27	0.276
<i>acc</i>	0.87	0.435	0.8	0.384	0.61	0.104
<i>acly</i>	0.85	0.153	0.51	0.058	0.49	0.067
<i>atgl</i>	0.71	0.419	0.8	0.072	1.35	0.025*

CF, 常规斑马鱼; GF, 无菌无斑马鱼; CN, 斑马鱼未接触抗生素; AN, 抗生素处理的斑马鱼。b基因全名: *apoa4*: 载脂蛋白A-IV b; *hsl*: 激素敏感性脂肪酶; *slc2a1a*: 溶质载体家族2, 促进葡萄糖转运蛋白成员1; *lss*: 羊毛甾醇合成酶 (2,3-氧化角鲨烯 - 羊毛甾醇环化酶); *fabp6*: 脂肪酸结合蛋白6; *acsl5*: 酰基辅酶A合成酶长链家族成员; *cd36*: 分化簇36, 也称为血小板糖蛋白4, 脂肪酸转位酶; *gpat*: 甘油-3-磷酸酰基转移酶; *ppary*: 过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ ; *cox15*: 细胞色素c氧化酶亚基; *acox1*: 过氧化物酶体酰基辅酶A氧化酶1; *cpt1b*: 肉毒碱棕榈酰转移酶I b; *plcg2*: 1-磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸磷酸二酯酶 $\gamma$ -2; *cpt1a*: 肉毒碱棕榈酰转移酶I a; *cyp51*: 细胞色素P450, 家族51; *srebp*: 甾醇调节元件结合蛋白; *acc*: 乙酰辅酶A羧化酶; *acly*: ATP柠檬酸裂解酶; *dgat2*: 二酰基甘油O-酰基转移酶2; *atgl*: 脂肪甘油三酯脂肪酶。C折叠变化是CF与GF, CN与AN的比率。\* p < 0.05, \*\* p < 0.01。

### 03 在两种模型中响应细菌存在的基因



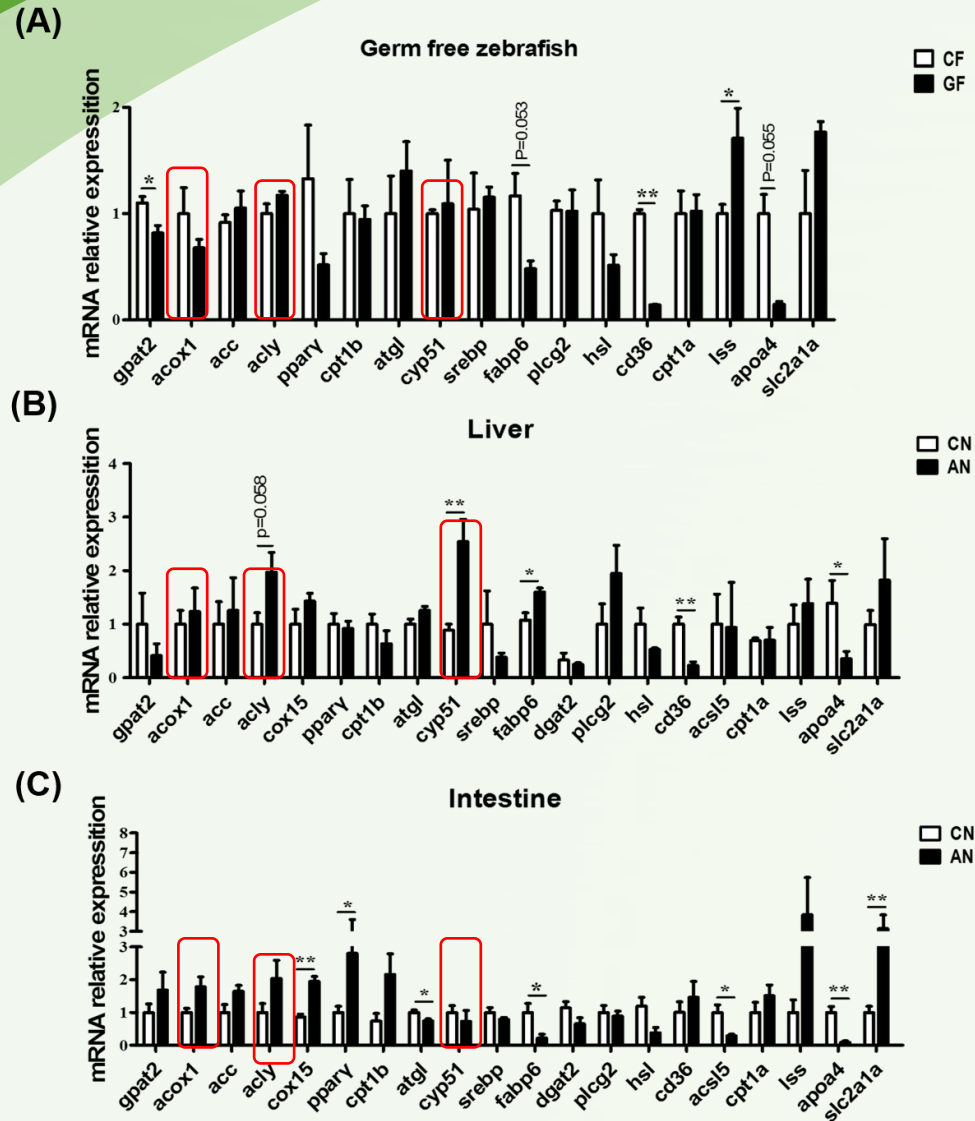
图A apoa4的表达水平常规斑马鱼比无菌或抗生素处理的鱼更高，证实了apoa4与肠道细菌之间的密切关系。常规斑马鱼中激素敏感性脂肪酶 (hsl) 的表达水平高于无菌或抗生素处理的。

在本研究中先前在GF中检测到的基因在CN和AN组的肝脏或肠道中被检测到。与CN组相比，AN组的肝脏中cyp51和fabp6的基因表达显著增加，而cd36和apoa4显著降低（图B）。在肠中，cox15, PPAR $\gamma$ 和slc2a1a显著而增加ATGL, fabp6, acsl5和APOA4与CN基（图C）相比AN组显著降低。

04

讨论

## 04 受抗生素治疗影响的基因



一些基因在常规和无菌斑马鱼之间保持不变或在这两个模型中显示出与肠道微生物群不一致的模式，表明这些基因的表达与其他因子有关而非肠道微生物群有关。

并且ppary受抗生素治疗的影响现，表达上调。acox1在抗生素处理的斑马鱼的肠道中被上调，尽管没有检测到显著差异。这些基因可能更受抗生素治疗而不是肠道细菌的影响

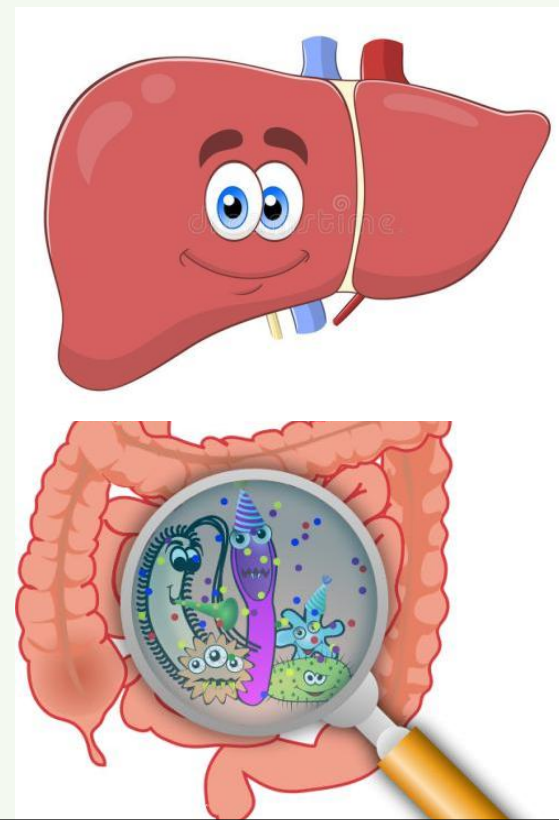
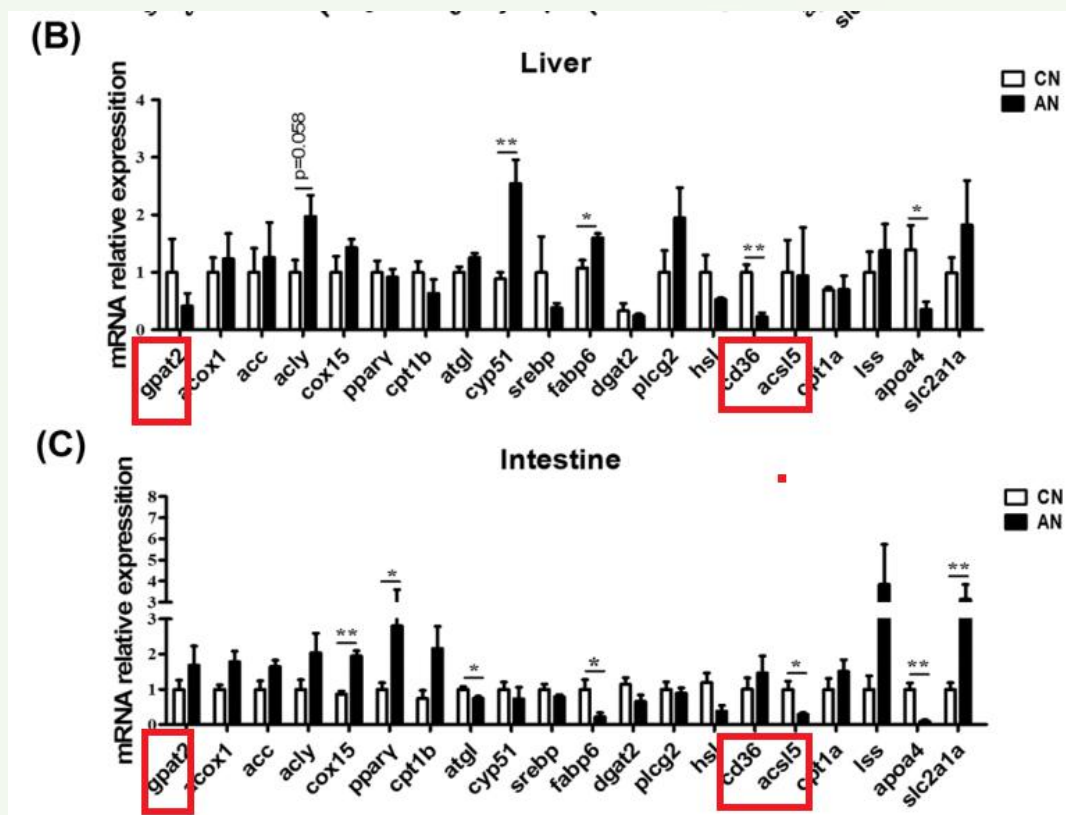
研究表明，抗生素降低了肝脏和肠道中dgat2的表达因此，可以假设该基因与抗生素治疗更相关。

研究中，atgl基因的表达水平在常规和无菌斑马鱼之间没有显示任何变化，但当斑马鱼用抗生素治疗时，它在肝和肠中发生了变化

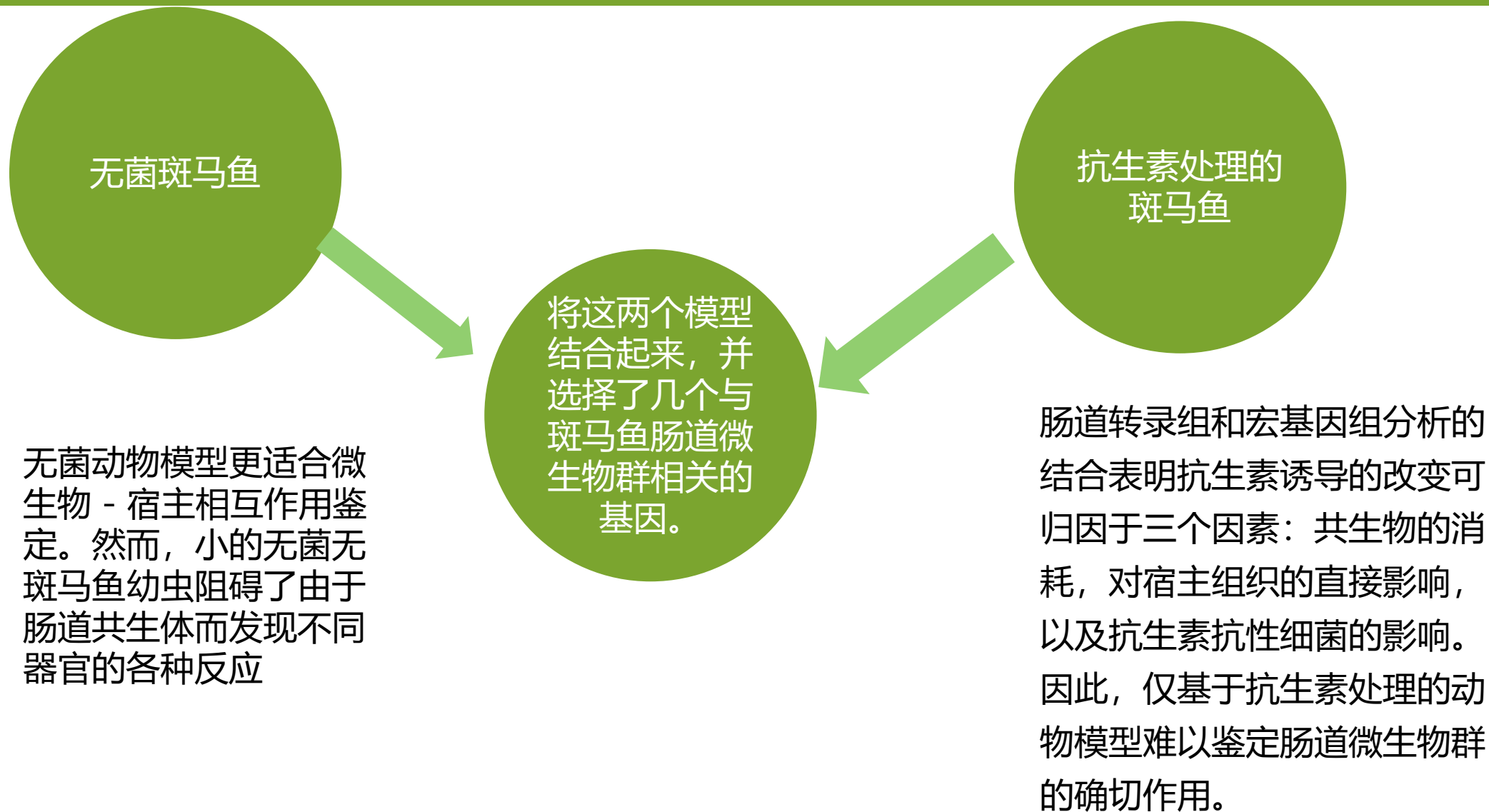
先前的研究表明参与线粒体脂肪酸氧化的两种肉毒碱棕榈酰转移酶cpt1a和cpt1b在无菌斑马鱼中被上调。但是本研究中没有体现。因此，这些基因的表达是否与肠道或抗生素治疗有关仍不清楚。

## 04显示针对细菌存在的器官特异性反应的基因

acsl5在常规斑马鱼中被上调。先前研究已经表明acsl5的表达在肝细胞系中起作用以促进脂肪酸摄取，导致储存增加。该结果表明acsl5的表达可能与肠道微生物群有关。基因，cd36和gpat2，负责分别输入细胞内的脂肪酸和甘油酯生物合成。无菌或抗生素处理的斑马鱼的底物利用效率较低。在常规斑马鱼中发现了这些基因的更高表达水平，特别是在肝脏中。



## 04 无菌和抗生素治疗斑马鱼模型的优缺点



05

结论

该比较研究显示，与无脂或抗生素处理的斑马鱼相关的脂质分解代谢和胆固醇合成相关的基因上调，而与传统斑马鱼相关的脂质吸收或生物合成相关的基因则增加。比较了无菌斑马鱼或抗生素处理斑马鱼在鱼类营养或代谢研究中揭示肠道微生物功能的优缺点。该研究为将来研究中两种模型的使用提供了有价值的信息，以揭示鱼类的能量稳态和脂质代谢。





1 我们能不能利用这两种模型来确定是哪一类或者哪一种微生物使脂肪的合成代谢相关基因表达量发生了变化。可以通过抗生素处理，无菌斑马鱼

**THANK YOU!**

敬请各位老师同学批评指正