



一株东方醋酸杆菌分离与其促进果蝇生长发育

李玉娟^{1,3#}, 苏琬真^{1,4#}, 朱旭峰², 惠新琳², 樊晓光³, 姚红³, 常新剑^{2*}, 刘威^{1,5*}

¹山西医科大学汾阳学院科技中心, 山西 汾阳 032200

²山西省汾阳医院, 山西 汾阳 032200

³山西医科大学基础医学院, 微生物与免疫学教研室, 山西 太原 030001

⁴山西医科大学汾阳学院基础医学系, 山西 汾阳 032200

⁵山西医科大学汾阳学院医学检验系, 山西 汾阳 032200

摘要:【目的】分离与鉴定黑腹果蝇体内醋酸杆菌, 并研究其对宿主生长发育的促进作用。【方法】利用醋酸杆菌选择性培养基分离果蝇肠道醋酸杆菌; 通过革兰氏染色和 16S rRNA 基因比对鉴定菌种; 肠道定植实验验证共生关系; 发育历期和生长速率实验检测其促进果蝇生长作用; 免疫荧光染色技术检测肠道细胞增殖; RT-PCR 法检测促生长的分子标志物和相关的信号通路。【结果】菌株为东方醋酸杆菌 (*Acetobacter orientalis*), 可以持续地定植在果蝇肠道及其培养基中, 并且明显促进果蝇的生长。东方醋酸杆菌通过胰岛素信号通路增加肠分裂细胞的数量和促进蜕皮激素的分泌。【结论】东方醋酸杆菌是果蝇的一种共生菌, 对果蝇肠道结构和机体发育具有重要的作用。

关键词: 果蝇, 东方醋酸杆菌, 共生, 生长发育

人体, 特别是肠道, 栖息着数以万亿计的细菌和其他微生物^[1]。肠道为菌群提供生存场所和营养物质, 菌群帮助宿主消化食物, 产生益生物质, 调控宿主多种生理活动^[2], 因此二者建立起互利互惠的共生关系。这种互利互惠的关系对人类健康、生态和遗传变异是必不可少的^[3], 但是菌群的复杂性和多样性阻碍我们深入地研究其作用机制^[4-5]。近

年来, 果蝇作为一种研究宿主与细菌共生关系的模型, 因其容易建立无菌和悉生体系, 并且与人类的菌群和肠道结构具有较高保守性, 受到人们愈来愈多的关注^[6]。

在自然界, 果蝇多以腐烂水果为食, 并且喜欢在里面产卵, 后代幼虫一直在里面生活, 直至羽化为成虫。这些腐烂水果含有多种发酵微生物,

基金项目: 国家自然科学基金(31501175); 山西医科大学汾阳学院人才引进科研启动基金(1423)

*通信作者。常新剑, Tel: +86-358-7223686, E-mail: 619684779@qq.com; 刘威, Tel: +86-358-7235034, E-mail: wei1998@sina.com

#并列第一作者。

收稿日期: 2016-11-22; 修回日期: 2016-12-28; 网络出版日期: 2016-12-29

果蝇不可避免接触到多种微生物,可作为果蝇的天然菌库来源,因为果蝇需要经常从环境中补充细菌以维系它们的肠道微生物群落^[7]。研究证实,野外捕获和实验室饲养的果蝇体内有 20 多种细菌,醋酸杆菌是果蝇最常见共生菌之一^[8]。醋酸杆菌为革兰氏阴性菌,在自然界中普遍存在,常发现于土壤、植物和多种食物及部分动物体内,能够氧化糖或乙醇而产生乙酸,容易引起植物腐烂和食物变质。然而,醋酸杆菌引起的食物腐败却有利于自己生长和繁殖,同时有利于果蝇等半腐生昆虫在自然界生存,为它们创造一个新的生态位,增加物种的多样性。但是,果蝇共生醋酸杆菌种类及促进果蝇生长和发育的机制仍然大部分未知。

为此,本研究尝试用醋酸杆菌选择性培养基从果蝇肠道分离醋酸杆菌,最终我们分离到东方醋酸杆菌,并研究其促进果蝇生长和发育的功能。在此基础上,进一步探讨东方醋酸杆菌通过肠道细胞增殖、蜕皮激素分泌及胰岛素信号而促进生长的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和果蝇品系: 东方醋酸杆菌(分离方法见下);野生型果蝇 Oregon R。

1.1.2 主要试剂与仪器: 次氯酸钠(Sigma),Walch 消毒液(威莱),Taq 酶(大连宝生物),干酵母(安琪),基因扩增仪(Thermo, PX2),分光光度仪(岛津, UV-1800),冷冻离心机(上海力申, Neofuge 13R),测序(上海生工测序公司),显微镜(Leical, DM4000),反转录试剂盒(Invitrogen),RT-PCR 试剂盒(TaKaRa),兔源一抗 PH3 (Millipore),

抗兔二抗 -568 (Invitrogen),封片剂(Vector Laboratories),多聚甲醛(Merck),Triton X-100 (Sigma),4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI, Invitrogen),Trizol (Invitrogen),实时定量 PCR 仪(ABI)。

1.2 细菌的分离与鉴别

CO₂ 麻醉 10 只野生型成虫果蝇,解剖出肠道,置于冷的磷酸盐缓冲液中,75%乙醇洗涤 3 次,磷酸盐缓冲液清洗 3 次,加入 100 μL 磷酸盐缓冲液,研磨待用。适当稀释混合液,涂布均匀,用醋酸杆菌琼脂培养基(AC) 35 °C 培养 24 h,挑单菌克隆,并纯化 1 次。细菌 DNA 提取方法见参考文献[6],利用 16S rRNA 通用引物(F: AAAGATGGCATCATCATTCAAC, R: TACCGTC ATTATCTTCCCCAAA),利用 PCR 方法扩增此基因片段,送公司测序。将测出序列提交 GenBank,获取登录号。用 MEGA 6.0 软件作进化树,分析同源相似度^[9]。

1.3 体外培养

将东方醋酸杆菌按 2.5% 比例注入含有已知碳源(葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇)的 AC 培养基中,35 °C 有氧培养,检测 12 h 内的 OD 和 pH 值。

1.4 果蝇饲养

果蝇在温度 25 °C、湿度 50%–60%、光照周期 12L:12D 条件下培养^[2]。如无特殊说明,果蝇常规饲养培养基为标准玉米-酵母培养基^[10],发育和定植实验培养基和果蝇免疫染色培养基见参考文献[10–11]。

无菌和悉生果蝇建立方法详见文献[12],依次使用 Walch 消毒液、次氯酸钠和 75%乙醇洗消毒,获得无菌卵,转移到无菌培养基内,建立无菌体系(Germ free, GF)。在无菌体系基础上,于第 2

天在果蝇培养基中加入 1 OD (约 10^8 CFU) 单株菌或者混合菌, 建立悉生果蝇。本实验单株菌为东方醋酸杆菌(*Acetobacter orientalis*), 混合菌获得方法: 将果蝇用 75% 乙醇消毒 2 遍、无菌水清洗 2 遍, 研磨即可, 建立常规饲养(conventionally rear, CR)果蝇。

1.5 定殖实验和世代传递实验

1.5.1 定殖实验: 建立东方醋酸杆菌悉生果蝇模型, 分别取 1-3 龄幼虫、蛹、成虫(1 d、4 d、12 d、27 d)果蝇各 6 只, 75% 乙醇洗 1 遍, 磷酸盐缓冲液洗 3 次, 碾碎取 100 μ L, 使用 AC 培养基, 计数果蝇体内菌落数。取对应龄期培养基 1 g, 加入磷酸盐缓冲液碾碎, 取 100 μ L 计数培养基中的菌落数。

1.5.2 世代传递实验: 将东方醋酸杆菌悉生果蝇蛹经过 75% 乙醇消毒 2 遍, 磷酸盐缓冲液清洗 2 遍, 转移至无菌的 4% 酵母培养基中, 待其羽化并产卵后弃去成虫 G0 代, 分别检测 G1 代 3 龄幼虫、蛹和成虫肠道载菌量, 检测方法同定植实验。

1.6 发育历期和生长速率

1.6.1 发育历期: 每日记录 0.25%、0.50%、1.00% 酵母培养基中 CR、GF、东方醋酸杆菌果蝇成蛹和羽化成虫的数量(均以 20 只为标准), 分别计算蛹形成和羽化出现时间。

1.6.2 生长速率: 分别取 0.5% 和 1.0% 酵母培养基中 CR、GF、东方醋酸杆菌果蝇 10 只(1 d 幼虫至蛹), 置 -40 $^{\circ}$ C 冰箱 2 h, 置载玻片上, 显微镜拍照, ImajJ 软件计算体表面积。

1.7 免疫荧光染色^[13]

挑取酵母玉米培养基中 CR、GF、东方醋酸杆菌成虫果蝇(羽化 4 d)各 10 只, 在磷酸盐缓冲液中解剖肠道, 室温下 4% 多聚甲醛溶液固定 30 min, 含 0.2% 山羊血清和 0.1% 胎牛血清的 0.3%

PBST (Triton-X100) 封闭 30 min, 兔源一抗 PH3 (1:1000 稀释), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 抗兔二抗(1:1000)孵育 2 h, PBST 洗涤样品, DAPI (1:1000)染色 10 min, PBST 洗涤样品, 封片剂封片, 显微镜采集图像并统计。

1.8 实时定量 PCR

分别挑取 0.5% 酵母玉米培养基中 CR、GF、东方醋酸杆菌悉生果蝇 10 只(3 d 幼虫至蛹形成 3 d)。利用 Trizol 法提取总 RNA, 用 5 μ g RNA 为模板, 使用 oligo-dT 引物反转录 mRNA, 合成 cDNA。以 cDNA 为模板, 用引物 1 (F: CACTCCACATCCCACAGAG ATGGCGATGG, R: CCACGAGCTCATTCGTA ACT TTGC)检测 *Ptth* 转录水平, 用引物 2 (F: AACAGTG GCGGATTCGGTT, R: TACTCGG AGCATTGGAGG CAT)检测 *InR* 转录水平。以 *rp49* (F: GACGCTTCAAG GGACAGTATCTG, R: AAACGCGGTTTCAGCATGA) 作为参照基因, 计算公式为 $\Delta Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{参照基因}$, 相对表达量 = $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 。

1.9 数据分析

本文实验重复 3 次及以上, 以每组数据的平均值进行数据统计, 采用 *t* 检验(Student *t*-tests)分析。

2 结果和分析

2.1 细菌的分离与鉴别

利用醋酸杆菌选择性培养基, 从果蝇肠道内分离到 1 株醋酸杆菌。形态学鉴定结果为革兰氏阴性杆菌, 能利用常见糖类和乙醇, 与醋酸杆菌的形态和生化特征相符合。16S rRNA 基因测序有效片段长度为 1372 bp, 经过序列比对, 该菌株与 *A. orientalis* 亲缘关系最近, 属于醋酸杆菌第 6 类, 将这个菌株命名为 FY1, 基因序列已提交 Genbank,

登录号为 KX943564。与相关的菌株和常见肠道菌进化树见图 1-A, 菌株 FY1 与菊花中 *A. orientalis* NS 03 同源性最高, 同源性为 99.9% (1371/1372), 其次为谷物中 *A. orientalis* FJAT 13764, 同源性为 99.7% (1369/1372)。然而, 该菌株与果蝇常见肠杆菌关系较远, 同源性为 82.0% (744/907), 说明果蝇肠道菌具有多样性。

2.2 东方醋酸杆菌体外培养特征

利用无碳源 AC 培养基, 添加葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇作为碳源, 分别检测其 OD 和 pH。结果显示: 在 0 h 到 4 h 生长速度较慢, 4 h 到 8 h 进入对数生长期, OD 值达到 0.9, 10 h 后进入生长平台期(图 1-B), 说明东方醋酸杆菌可利用常见碳源而生长。伴随着细菌生长, 培养液 pH 发生同步变化(图 1-C)。0 h 到 4 h, pH 值缓慢下降, 4 h 到 6 h, 迅速下降, 6 h 到 12 h, 继续下降, 降为 4.3-3.8。东方醋酸杆菌均能利用 4 种碳源, 并且

显著地降低 pH。酸性环境下利于自身的增殖, 可能具有抑制病原微生物和霉菌作用, 提示东方醋酸杆菌可能是果蝇的一种益生菌。

2.3 东方醋酸杆菌在果蝇肠道定植情况

如图 2-A 所示, 果蝇 1-3 龄幼虫时期每个肠道载菌量分别为 1.5×10^4 、 1.4×10^3 、 1.4×10^5 , 蛹期肠道载菌量为 2.2×10^4 , 羽化后第 1 天、4 天、12 天、27 天成虫果蝇肠道载菌量分别为 3.0×10^4 、 1.2×10^4 、 1.1×10^4 、 3.8×10^5 , 说明东方醋酸杆菌有效定殖于各阶段果蝇的肠道。培养基细菌密度较高, 幼虫期对应时期每 1 克培养基细菌密度分别为: 4.8×10^6 、 1.7×10^5 、 7.2×10^5 , 蛹期培养基细菌密度为 1.2×10^6 , 成虫羽化后 1、4、12、27 d 细菌密度均在 10^4 以上(图 2-B), 说明东方醋酸杆菌在培养基中可以稳定存在。图 2-C 显示: 东方醋酸杆菌可以在后代 G1 代 3 龄幼虫期、蛹期、成虫期果蝇体内稳定的定植, 每个肠道载菌量分别为: 9.9×10^2 、 2.7×10^2 、

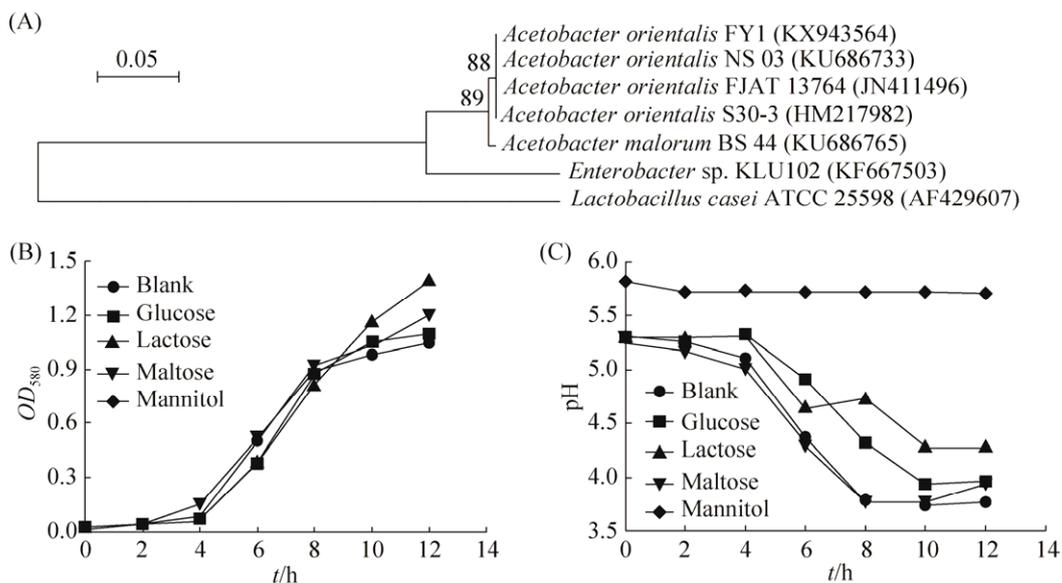


图 1. 东方醋酸杆菌和与其相关细菌的进化树和体外培养特性

Figure 1. Phylogenetic tree of *A. orientalis* and relatives and its *in vitro* features of culture. A: Phylogenetic tree of *A. orientalis* and its homologies. Bar: Nucleotide divergence; Number at notes present bootstrap percentages; Those in parentheses are GenBank accession No.. B: Growth of *A. orientalis* with 4 carbon sources in medium. C: pH curves of *A. orientalis* growing in medium with 4 carbon sources. Values represent mean±SEM.

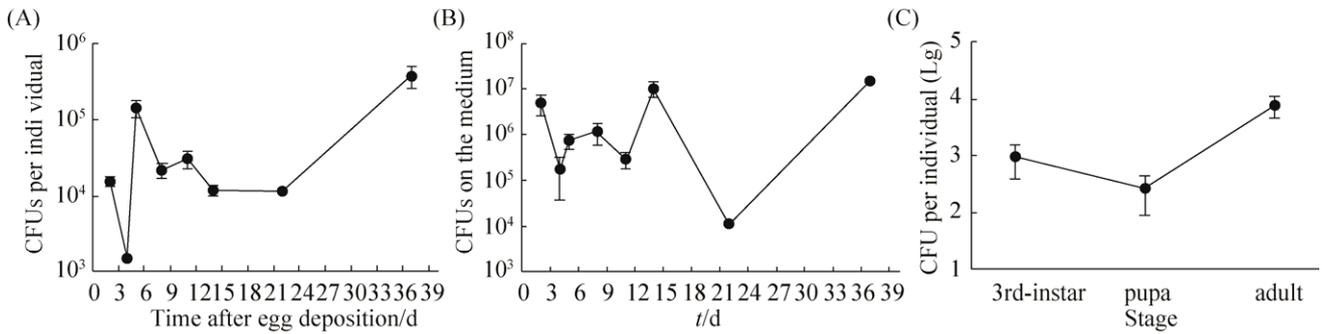


图 2. 东方醋酸杆菌是果蝇共生菌

Figure 2. *A. orientalis* was commensal bacteria of *Drosophila*. A: The amount of internal bacterial loaded of *A. orientalis* in various growth stages of the gut of *Drosophila*. B: The amount of internal bacterial loaded of *A. orientalis* in various growth stages of the culture medium of *Drosophila*. C: The amount of internal bacterial loaded of the progenies of *Drosophila* adults mono-associated with *A. orientalis*. Values represent mean \pm SEM.

7.3×10^3 , 说明东方醋酸杆菌可在世代间垂直传递。上面结果表明, 东方醋酸杆菌与果蝇紧密联系在一起, 是果蝇一种共生菌。

2.4 东方醋酸杆菌对果蝇发育历期的影响

实验结果证明, 在营养丰富培养基(2%酵母)情况下, CR 果蝇蛹形成时间为 6.0 d, GF 为 7.8 d, GF 比 CR 蛹形成时间延迟(图 3-A, $P < 0.001$), 说明细菌明显促进了果蝇的生长。东方醋酸杆菌共生果蝇蛹形成时间为 6.2 d, 与 GF 比较, 极显著地挽救 GF 果蝇发育迟缓($P < 0.001$), 而 CR 和东方醋酸杆菌共生果蝇蛹形成时间无差异($P > 0.05$), 说明东方醋酸杆菌与混合菌相当, 有促果蝇发育作用。同样, 东方醋酸杆菌在营养丰富条件下可以促进果蝇的羽化(图 3-B, $P < 0.001$)。特别是在培养基营养较匮乏(0.25%酵母)情况下, CR 果蝇的蛹形成时间为 12.6 d, GF 果蝇为 17.2 d, GF 与 CR 之间差距加大(图 3-A, $P < 0.01$), 而东方醋酸杆菌共生果蝇 9.0 d, 明显挽救了 GF 组发育停滞缺陷, 甚至促发育的效果比 CR 组更明显($P < 0.001$)。同样, 东方醋酸杆菌在营养匮乏条件下能更有效地促进果蝇的羽化(图 3-B)。因此, 以上结果说明, 东方醋酸杆菌促进果蝇的生长发育, 特别在营养条件

匮乏情况下, 显著地缩短果蝇发育历期, 甚至可以代替混合菌的作用。

2.5 东方醋酸杆菌对果蝇生长速率的影响

肠道微生物能合成菌体蛋白质, 降解难以消化的纤维素, 促进宿主对营养物质的消化吸收。但是, 研究发现, 无论是在营养丰富或者匮乏条件下, CR 和 GF 雌雄果蝇体重差异不明显(图 4-B, $P > 0.05$), 鉴于微生物缩短果蝇发育历期, 提示微生物可以增加果蝇生长率。为此, 我们用体表面积为参数, 比较 CR、GF 和东方醋酸杆菌 1 龄至蛹期的以定量果蝇生长速率。如图 4-A, 在营养丰富条件下 CR、GF 和东方醋酸杆菌共生果蝇生长速度无明显差异。然而, 在匮乏营养条件下(0.5%酵母), 1-3 d 的 CR、GF 和东方醋酸杆菌共生果蝇尺寸无明显差异, 随后二者差距逐步增大, 在第 6 天, CR 果蝇尺寸约为 GF 果蝇的 2 倍($P < 0.001$)。东方醋酸杆菌共生果蝇挽救了 GF 体表面积生长缓慢, 并与 CR 相当($P > 0.05$)。上述结果说明, 在匮乏营养条件下, 醋酸杆菌通过增加生长速率而促进果蝇发育。

2.6 东方醋酸杆菌对肠细胞增殖的影响

果蝇肠道上皮细胞更新速度很快, 需要肠道

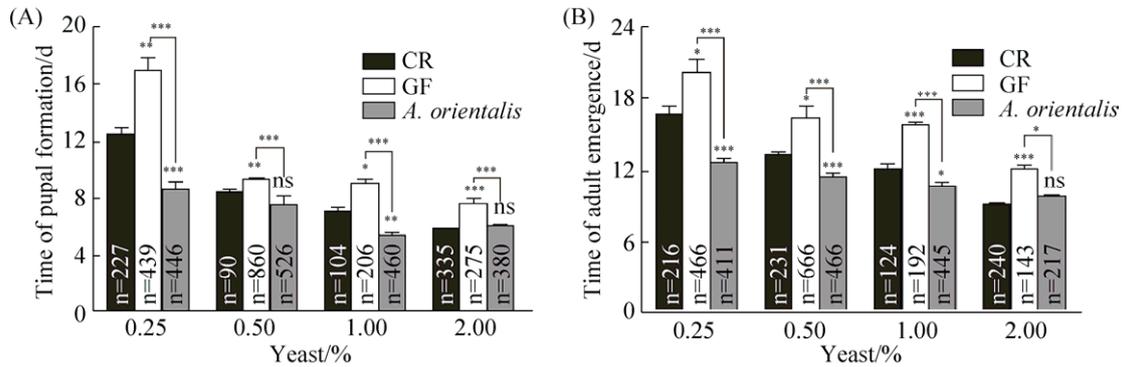


图 3. 东方醋酸杆菌促进果蝇生长发育

Figure 3. The *A. orientalis* promoted the growth and development of *Drosophila*. A: The timing of pupa formation of CR, GF or *A. orientalis* in the different concentrations of yeast. B: The timing of the emergence of adult of CR, GF or *A. orientalis* in the different concentrations of yeast. ns: $P>0.05$, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$; Values represent mean \pm SEM.

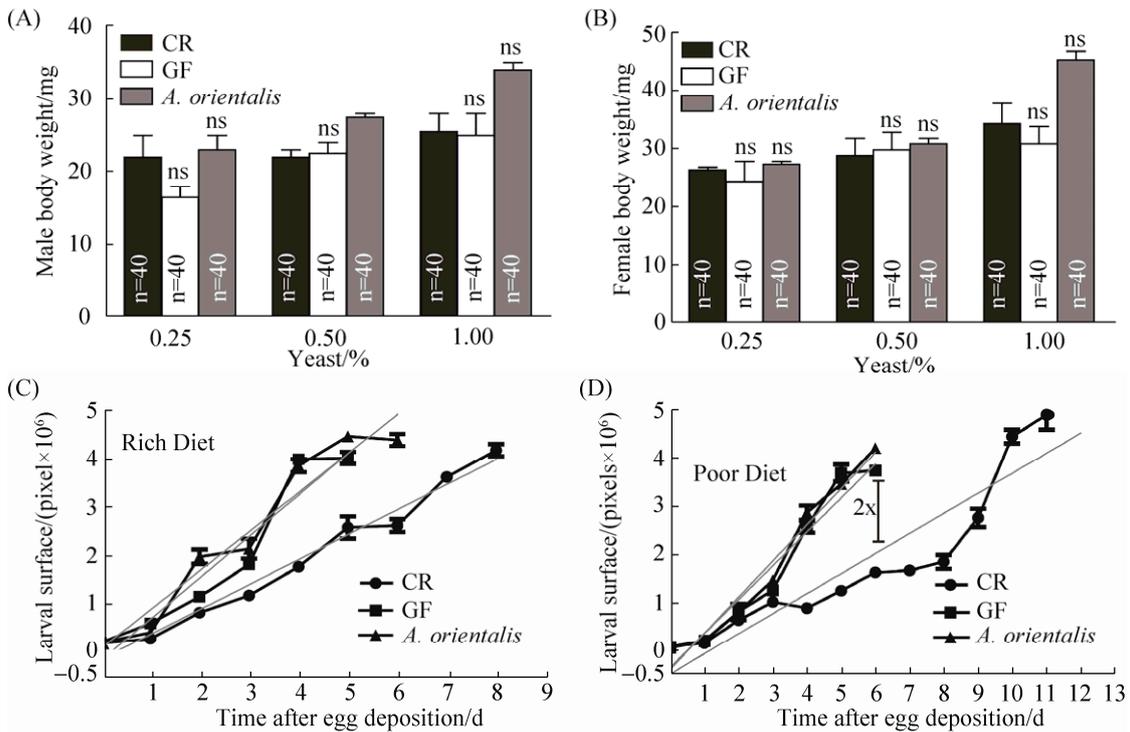


图 4. 东方醋酸杆菌增加幼虫生长速率

Figure 4. The *A. orientalis* improved the growth ratio of larval, but it had little effects on weight. A–B: The weight of male and female *Drosophila* on different concentrations of medium. C–D: Larval surface of CR or GF, or *A. orientalis* associated larvae over time when grown on rich (1.0% yeast) or poor diet (0.5% yeast). Linear regression curves are included. CR/Poor Diet, $Y=693900X-219500$; GF/Poor Diet, $Y=410400X-349700$; *A. orientalis*/Poor Diet, $Y=740600X-260100$; CR/Rich Diet, $Y=855100X-182500$; GF/Rich Diet, $Y=516000X-156100$; *A. orientalis*/Rich Diet, $Y=806500X-627300$. Values represent mean \pm SEM (ns: $P>0.05$; *: $P<0.05$).

细胞分裂增殖以补充, 因此肠分裂细胞数是检测肠道结构和功能的指标之一。利用免疫荧光染色法, 使用标记分裂中期细胞的抗体 PH3, 检测果蝇肠道细胞分裂情况。结果发现, CR 果蝇中肠分裂中期细胞数目为 12.7 个(图 5-A 和 D), GF 果蝇为 0.8 个, GF 比 CR 数目明显减少(图 5-B 和 D, $P<0.001$); 东方醋酸杆菌共生果蝇为 5.0 个, 数目明显增多, 与 GF 差异明显(图 5-C 和 D, $P<0.001$), 明显地挽回 GF 果蝇肠细胞分裂增殖的缺陷。CR、GF 和东方醋酸杆菌共生果蝇前肠和后肠的细胞分裂数目无显著性差异($P>0.05$)。

2.7 东方醋酸杆菌对脑促胸腺激素分泌的影响

在果蝇中, 大脑分泌的促胸腺激素(*PTTH*)启动类固醇激素 20-羟基分泌, 从而促进果蝇从 3 龄幼虫

到蛹期的转变^[14]。*PTTH* 基因表达受到时间的调控, 在三龄晚期和成蛹早期表达量较高, 因此这个基因的表达成为评价果蝇发育状况的分子指标。用 RT-PCR 技术检测不同时期果蝇体内脑促胸腺激素的转录水平。如图 6-A 显示: *PTTH* 表达量在 CR 果蝇第 6 天出现了高峰, 而 GF 果蝇 11 d 才出现峰值, GF 比 CR 果蝇明显迟缓大约 5 d, 且 CR 表达量比 GF 高($P<0.001$)。*PTTH* 表达量在东方醋酸杆菌果蝇第 6 天出现峰值, 比 GF 果蝇出现时间提前 4 d, 其表达量比 GF 果蝇高(图 6-A, $P<0.01$), 并且和 CR 相当, 说明东方醋酸杆菌有效挽救了 GF 果蝇发育迟缓问题, 并加快促进了幼虫期向蛹期过渡。

2.8 东方醋酸杆菌对胰岛素信号通路调控的影响

已有报道, 肠道菌可以通过胰岛素信号通路

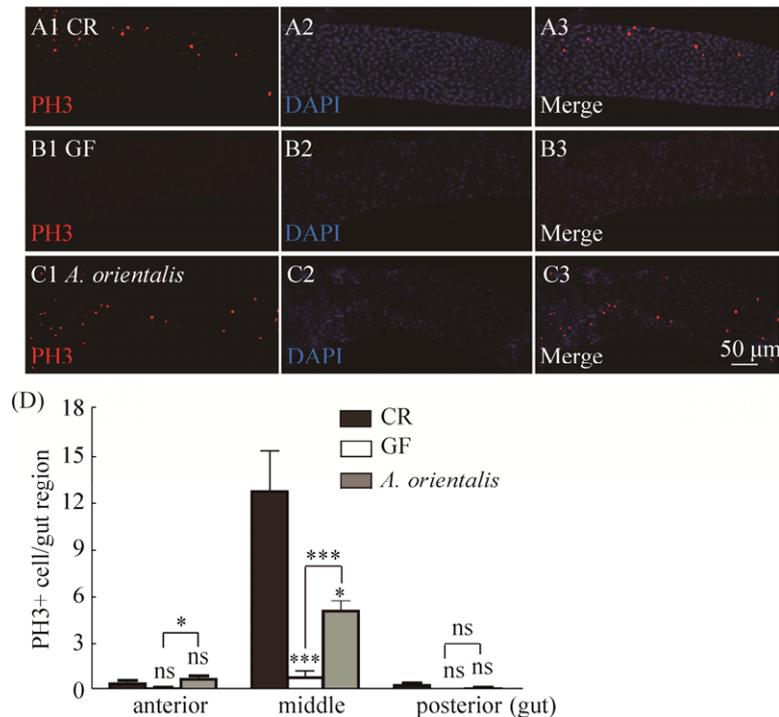


图 5. 东方醋酸杆菌促进果蝇肠细胞分裂增殖

Figure 5. *A. orientalis* promoted the proliferation of *Drosophila* intestinal cells. A–C: The representative imaging of mitotic cells in guts of CR, GF and *A. orientalis* flies (Red as PH3 marker, Blue as DAPI marker, Bar=50 μ m). D: The quantification of mitosis in gut region of CR, GF and *A. orientalis* flies. The anterior gut, midgut and posterior are parts of gut regions, n=10. Values represent mean \pm SEM. Ns: $P>0.05$, *: $P<0.05$, ***: $P<0.001$.

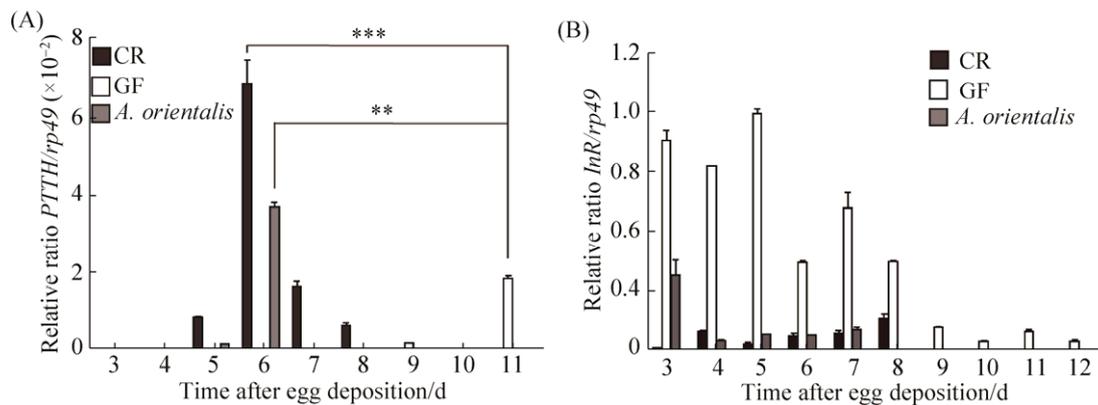


图 6. 东方醋酸杆菌促进果蝇激素分泌和调节果蝇胰岛素信号通路

Figure 6. The *A. orientalis* promoted the secretion of *Drosophila* hormone and was required to regulate the insulin signal pathway. A: *PTTH* mRNA levels for CR, GF and *A. orientalis*-associated *Drosophila*. B: *InR* mRNA levels for CR, GF and *A. orientalis*-associated *Drosophila*. Values represent mean \pm SEM. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

促进果蝇的发育和生长^[7]。*InR* 为胰岛素信号通路负调控基因，即低 *InR* 基因表达量关联高活性的胰岛素信号通路。如图 6-B 所示，*InR* 表达量在 CR 果蝇前 8 d 一直很低，而 GF 果蝇对应时期的高表达($P < 0.001$)，说明肠道混合菌能激活胰岛素信号通路。GF 果蝇后期(9 d 之后)，*InR* 表达量才开始迅速降低，说明这个时期的 GF 果蝇胰岛素信号才被激活，比 CR 果蝇时间大大延迟。东方醋酸杆菌共生果蝇，*InR* 表达量除了第 3 天表达量较高之外，随后表达水平一直很低，与 CR 果蝇相当，并且比对应日龄 GF 果蝇低($P < 0.001$)，说明东方醋酸杆菌能增加胰岛素信号通路活性。

3 讨论

本实验首次从果蝇肠道分离出了东方醋酸杆菌，并且证明东方醋酸杆菌是果蝇共生菌之一，能够在果蝇世代间传递。它通过增加生长速率而显著地促进果蝇的生长发育，缩短了成蛹和成虫羽化时间，从而缩短果蝇生长周期。在细胞和分子水平上，东方醋酸杆菌增加肠细胞分裂和增殖，促进果蝇体内脑促胸腺激素分泌，同时通过激活

胰岛素信号通路，从而促进果蝇生长发育。东方醋酸杆菌常存在于果蔬、花卉、酸乳的食物中，能分解乙醇成乙酸，引起植物腐烂和食物腐败，会引起经济损失和对人类健康不利。然而，从果蝇与东方醋酸杆菌角度出发，东方醋酸杆菌通过自身酶系分解水果里面的营养物质，引起的腐烂不仅有利于自己的繁殖，也为果蝇提供更多可利用的营养物质，为果蝇创造一个新的生态位，有利于果蝇的生存和繁衍。果蝇是半腐生昆虫，主要依靠采食腐烂水果，在采食的同时可以携带东方醋酸杆菌，传播的范围更广。因此，果蝇与东方醋酸杆菌在自然环境中形成了互惠互利的共生关系。

这种共生关系首先体现在东方醋酸杆菌促进了果蝇生长发育。我们和别人的研究发现，如果没有微生物，即使在蛋白和葡萄糖等营养充足条件下，果蝇也无法生存，说明微生物是果蝇生长发育必需的^[4]。果蝇肠道菌群成员能影响某些动物的遗传因素，并影响机体内重要营养物质组成，如甘油三酯(脂肪)含量。研究发现，肠道微生物丰富度高可增进营养物质消化和吸收，增加宿主体营养储备^[15]。醋酸杆菌科为果蝇菌群一个重要组成部分，其可以降解纤维素，有助于宿主消化

吸收营养物质，并且可合成优质菌体蛋白，供宿主利用。东方醋酸杆菌为醋酸杆菌科成员，可代谢产生乙酸，降低宿主体内的 pH 值，降低假单胞菌病原体感染，提示东方醋酸杆菌具有抑菌或杀菌活性^[16]。同时，果蝇微生物通过激发肠道上皮细胞固有免疫信号而促进免疫活力^[17]，我们推测东方醋酸杆菌也可能提高机体的免疫力和抗病力。

胰岛素信号通路在葡萄糖摄取，动态调控着许多蛋白质转录和翻译，促进细胞分裂增殖，调控机体发育、生长和代谢全过程^[18]。已有文献报道，醋酸杆菌和乳酸杆菌为果蝇体内主要的共生菌^[8]，可调节胰岛素信号和 TOR 信号通路，调节宿主自我平衡程序，控制发育率、尺寸大小、能量代谢和肠干细胞的活性^[7-8,11,19]。本研究发现，东方醋酸杆菌为醋酸杆菌一个种，可以使胰岛素信号提前出现(图 6-B)，和前人研究一致，提示胰岛素信号参与了促进果蝇发育。东方醋酸杆菌增加果蝇中肠的分裂细胞数目(图 5-D)，提示胰岛素信号促进细胞分裂，调节宿主肠道内稳态和功能，为营养物质的吸收利用创造了必要条件。胰岛素信号通路与活性体内脑促胸腺激素相关联(图 6-A)，可促进果蝇由幼虫期向蛹期转变(图 3)，加速果蝇的生理变态反应。因此，东方醋酸杆菌参与调控胰岛素信号，说明东方醋酸杆菌是果蝇重要的共生菌和益生菌。

上述结果表明，东方醋酸杆菌促进了果蝇生长发育，增加了果蝇肠道微生物种类，说明了肠道微生物的多样性，丰富的肠道微生物菌群可参与宿主对营养素的消化、吸收与合成。果蝇模型是一个较好的简单的研究工具，与其体内携带的微生物紧密相关，用果蝇模型研究共生菌的作用可以为研究人类疾病提供一定的借鉴。

参考文献

[1] Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes

intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 2009, 9(5): 313–323.

- [2] Marchesi JR, Adams DH, Fava F, Hermes GDA, Hirschfield GM, Hold G, Quraishi MN, Kinross J, Smidt H, Tuohy KM, Thomas LV, Zoetendal EG, Hart A. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut*, 2016, 65(2): 330–339.
- [3] Dethlefsen L, Mcfall-Ngai M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature*, 2007, 449(7164): 811–818.
- [4] Cao Y, Wang YY, Zheng XF, Li F, Bo XC. RevEcoR: an R package for the reverse ecology analysis of microbiomes. *BMC Bioinformatics*, 2016, 17: 294.
- [5] Scanlan PD, Knight R, Song SJ, Ackermann G, Cotter PD. Prevalence and genetic diversity of *Blastocystis* in family units living in the United States. *Infection, Genetics and Evolution*, 2016, 45: 95–97.
- [6] Liu W, Li YJ, Liu XL, Zhuo P, Yao H. *Clostridium perfringens* promotes the growth and development of *Drosophila melanogaster*. *Acta Entomologica Sinica*, 2016, 59(5): 530–537. (in Chinese)
刘威, 李玉娟, 刘晓梁, 卓萍, 姚红. 产气荚膜梭菌促进黑腹果蝇的生长和发育. *昆虫学报*, 2016, 59(5): 530–537.
- [7] Blum JE, Fischer CN, Miles J, Handelsman J. Frequent replenishment sustains the beneficial microbiome of *Drosophila melanogaster*. *mBio*, 2013, 4(6): e00860–13.
- [8] Storelli G, Defaye A, Erkosar B, Hols P, Royet J, Leulier F. *Lactobacillus plantarum* promotes *Drosophila* systemic growth by modulating hormonal signals through TOR-dependent nutrient sensing. *Cell Metabolism*, 2011, 14(3): 403–414.
- [9] Liu W, Zhu WY, Yao W, Mao SY. Isolation and identification of a lactate-utilizing, butyrate-producing bacterium and its primary metabolic characteristics. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(3): 435–440. (in Chinese)
刘威, 朱伟云, 姚文, 毛胜勇. 一株乳酸利用、丁酸产生菌的分离与鉴定及代谢特性的初步研究. *微生物学报*, 2007, 47(3): 435–440.
- [10] Broderick NA, Buchon N, Lemaitre B. Microbiota-induced changes in *Drosophila melanogaster* host gene expression and gut morphology. *mBio*, 2014, 5(3): e01117–14.
- [11] Shin SC, Kim SH, You H, Kim B, Kim AC, Lee KA, Yoon JH, Ryu JH, Lee WJ. *Drosophila* microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling. *Science*, 2011, 334(6056): 670–674.
- [12] Brummel T, Ching A, Seroude L, Simon AF, Benzer S. *Drosophila* lifespan enhancement by exogenous bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(35): 12974–12979.
- [13] Liu W, Jiang FF, Bi XL, Zhang YQ. *Drosophila* FMRP participates in the DNA damage response by regulating G2/M cell cycle checkpoint and apoptosis. *Human Molecular Genetics*, 2012, 21(21): 4655–4668.
- [14] Garelli A, Gontijo AM, Miguela V, Caparros E, Dominguez M. Imaginal discs secrete insulin-like peptide 8 to mediate plasticity of growth and maturation. *Science*, 2012, 336(6081): 579–582.
- [15] Chaston JM, Dobson AJ, Newell PD, Douglas AE. Host genetic control of the microbiota mediates the *Drosophila*

- nutritional phenotype. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(2): 671–679.
- [16] Overend G, Luo Y, Henderson L, Douglas AE, Davies SA, Dow JAT. Molecular mechanism and functional significance of acid generation in the *Drosophila* midgut. *Scientific Reports*, 2016, 6: 27242.
- [17] Lhocine N, Ribeiro PS, Buchon N, Wepf A, Wilson R, Tenev T, Lemaitre B, Gstaiger M, Meier P, Leulier F. PIMS modulates immune tolerance by negatively regulating *Drosophila* innate immune signaling. *Cell Host & Microbe*, 2008, 4(2): 147–158.
- [18] Wei YL, Gokhale RH, Sonnenschein A, Montgomery KM, Ingersoll A, Arnosti DN. Complex *cis*-regulatory landscape of the insulin receptor gene underlies the broad expression of a central signaling regulator. *Development*, 2016, 143(19): 3591–3603.
- [19] Douglas AE. Is the regulation of insulin signaling multi-organismal? *Science Signaling*, 2011, 4(203): pe46.

Isolation of *Acetobacter orientalis* and their promotion of the growth and development of *Drosophila melanogaster*

Yujuan Li^{1,3#}, Wanzhen Su^{1,4#}, Xufeng Zhu², Xinlin Hui², Xiaoguang Fan³, Hong Yao³, Xinjian Chang^{2*}, Wei Liu^{1,5*}

¹ Science and Technology Center, Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang 032200, Shanxi Province, China

² Fenyang Hospital of Shanxi Province, Fenyang 032200, Shanxi Province, China

³ Department of Microbiology and Immunology, School of Basic Medical Sciences, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

⁴ Department of Clinical Medical, Fenyang College, Shanxi Medical University, Fenyang 032200, Shanxi Province, China

⁵ Department of Medical Laboratory Science, Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang 032200, Shanxi Province, China

Abstract: [Objective] This study was aimed to isolate and identify *Acetobacter* strains from *Drosophila melanogaster*, and to study their roles in promoting the growth of hosts. [Methods] Selective culture method was used to isolate *Acetobacter*; Gram-staining and 16S rRNA gene blast was used to identify strains. Intestinal colonization test was used to verify the commensalism. Developmental time and growth rate were used to evaluate the effect of the bacterial isolates on hosts' development. Immunofluorescence staining was used to check the mitosis in gut. RT-PCR was used to assess the molecular biomarker of development and development-associated cellular signaling. [Results] The strain was identified as *Acetobacter orientalis* and it colonized the gut of *Drosophila* and fly medium, and significantly promoted the growth of the host. Furthermore, *Acetobacter orientalis* enhanced the number of mitotic cells in gut, and promoted the secretion of growth hormone of hosts by regulating the insulin signal pathway. [Conclusion] *Acetobacter orientalis* was one of commensal bacteria of *Drosophila*, and maintained the structure of intestine and promote the growth of hosts.

Keywords: *Drosophila*, *Acetobacter orientalis*, commensalism, development

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31501175) and by the Research Starting Fund for Talented Scholars of Shanxi Medical University Fenyang College (1423).

*Corresponding author. Xinjian Chang, Tel: +86-358-7223686, E-mail: 619684779@qq.com; Wei Liu, Tel: +86-358-7235034, E-mail: weil998@sina.com

#Those authors contributed equally to this work.

Received: 22 November 2016; Revised: 28 December 2016; Published online: 29 December 2016