



健康藏族与汉族大学生肠道细菌多样性研究

刘怡萱^{1,2}, 曹鹏熙¹, 马红梅¹, 刘星^{1,2,3*}

¹ 西藏大学理学院, 西藏 拉萨 850000

² 西藏大学青藏高原生态与环境研究中心, 极端环境生物适应与进化实验室, 西藏 拉萨 850000

³ 武汉大学生命科学院, 湖北 武汉 430072

摘要:【目的】探究生活在相同环境下, 同年龄段健康藏族人群和汉族人群肠道细菌组成的多样性特征及其可能的成因。【方法】入选同专业的 20–24 岁男性健康藏族学生和汉族学生各 20 名, 同一时间段收集新鲜粪便, 提取新鲜粪便细菌总 DNA, 通过高通量测序和生物信息学分析, 结合对饮食习惯的问卷调查, 研究健康藏族学生与汉族学生肠道细菌多样性与饮食习惯之间的关系。【结果】从 40 份样本中, 测序共得到 2880 个 OTU, alpha 和 beta 多样性分析表明, 生活在相同环境下, 不同民族男性学生的肠道细菌组成有明显差异。Prevotella 9、Bacteroides 和 Lachnospirillum 等 18 个属为两民族学生共有, 同时, Prevotella 9、Faecalibacterium 和 Succinivibrio 等 10 个属细菌为对两民族学生肠道细菌组成差异具有显著性影响的标志性菌属。进一步聚类分析表明, 所有学生样本分为 ETF 型、ETP 型、ETF 和 ETB 混合型 3 种不同肠型, 随访调查结果显示不同类型分别对应以脂肪为主和以淀粉为主的不同饮食习惯。【结论】生活在相同环境下, 健康藏族和汉族学生的肠道细菌组成特征及其差异可能与遗传因素及饮食习惯密切相关。

关键词: 肠道微生物, 多样性, 16S rRNA, 肠型, 饮食习惯

肠道微生物参与营养吸收、物质代谢、免疫防御及情绪调节等重要生理过程, 与人类的多种疾病有直接或间接的关系, 近年来被称为人体的“第二套基因组”^[1]。随着测序技术和各种组学的不断发展和完善, 人类对肠道微生物与人体之间相互作用的分子机制了解得越来越深入。有研究表明, 人类肠道中存在着 1000 多种不同的细菌^[2], 但

是在单独个体中仅仅包含其中的 160 种左右, 并且其组成多样性在不同个体之间有着惊人的差异^[3]。相关的研究发现, 影响人体肠道微生物组成的因素包括遗传、饮食、环境及健康等多个方面^[4–5]。

对我国不同民族健康人群的肠道微生物群落结构特征的研究同样发现肠道微生物在不同民族和地域之间存在差异, 但导致各民族健康人群之

基金项目: 西藏自治区自然科学基金(2016ZR-TU-04); 2019 年中央支持地方高校改革发展专项资金[藏财预指(2019)01 号]

*通信作者。Tel/Fax: +86-27-68753780; E-mail: xingliu@whu.edu.cn

收稿日期: 2019-01-11; 修回日期: 2019-03-31; 网络出版日期: 2019-06-06

间肠道微生物群落结构形成差异的主要因素是什么依然并不十分清楚^[6-10]。因此,为了探讨遗传(民族)背景和饮食习惯与健康人群肠道微生物群落结构的相关性,同时消除生活环境的影响,本文通过对西藏大学在校的藏族和汉族健康大学生各 20 名,开展饮食习惯问卷调查和粪便菌群结构研究,分析健康藏族人群及高原习服情况下的健康汉族人群肠道细菌的核心菌群组成特征及其可能的影响因素,为进一步深入研究高原环境下肠道微生物组成与人群健康的关系提供基础。

1 材料和方法

1.1 研究对象

本文研究对象来自西藏大学纳金校区同一专业 20-24 岁男性学生志愿者,藏族及汉族各 20 名。所有志愿者身体健康,无吸烟史,无饮酒史,无特殊饮食偏好,在校集体生活 3 个月以上,且近 3 个月内未服用抗生素及其他抗腹泻类或减肥类药物,对样品用途知情并同意。

1.2 问卷调查及样品采集

所有志愿者在样品采集前接受饮食信息问卷调查及采样方法培训。问卷内容包括志愿者的民族、年龄、身高、体重、生源地、生活环境(牧区/农区)、对糌粑、奶渣、风干牛肉等藏族传统食物及肉类、鸡蛋、果蔬、米饭等汉族食物的摄入量。对上述指标进行多元方差分析(R 语言 *vegan* 包, version 3.5.1),得到各指标对肠道数据影响的显著性。样品采集由所有志愿者个人在 2017 年 6 月 10 日同一天完成。用一次性采样勺采集约 10 g 新鲜晨便样品,置于 50 mL 无菌离心管中,加入 2-3 倍体积 95% 的酒精充分混匀, -80 °C 保存。

1.3 宏基因组 DNA 提取及 16S rRNA 片段 PCR 扩增

按照 QIAamp DNA Mini Kit (德国 QIAGEN 公司)说明提取粪便样品中总 DNA,用 1% 琼脂糖凝胶(大连 TaKaRa 公司)电泳检测 DNA 样品纯度及浓度。使用通用引物 338F (5'-ACTCCTACGGG AGGCAGCA-3')和 806R (5'-GGACTACHVGGGT WTCTAAT-3')对细菌 16S rRNA V3-V4 区进行 PCR 扩增(德国 Eppendorf 公司)。PCR 反应体系为: 10×Buffer 5 μL, 4×dNTP 混合物 5 μL, MgCl₂ 3 μL, 引物各 2.6 μL, 模板 2 μL, *Taq* 酶 0.4 μL, 加 ddH₂O 补充至 50 μL。PCR 反应条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min, 30 次循环, 72 °C 终端延伸 7 min, 4 °C 终止。

1.4 高通量测序及生物信息学分析

PCR 产物纯化后使用 Illumina MiSeq 平台,利用双末端测序(Paired-End)的方法,构建小片段文库进行测序,所得结果使用美吉公司 I-Sanger 云平台(<http://www.i-sanger.com/>)进行生物信息学及统计学分析。

使用 Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME, version 1.17)软件^[11]对测序原始数据进行质量控制。利用 Usearch (vsesion 7.0)软件^[12]按照 97% 相似性对非重复序列进行可操作分类单元(OTU)聚类,基于 Silva (Release128)数据库^[13]对所得 OTU 在不同分类学水平下进行注释,利用 *mothur* (version v.1.30.1)软件^[14]计算 97% 相似度的 OTU 不同随机抽样下的 Alpha 多样性指数,利用 R 语言制作稀释曲线图。利用 R 语言在属水平上基于 Bray-Curtis 距离算法进行 principal coordinates analysis (PCoA)统计分析和作图。利用 QIIME 软件基于 Bray-Curtis 距离进行 ANOSIM 及 Adonis 组间相似性分析,检验组间差异的显著性。

根据分类学分析结果,利用 R 语言在门和属水

平上对藏、汉两族学生样本的群落组成和相对丰度进行作图(将丰度小于 0.01 的门或属合并为 others), 分析两民族学生样本的共有菌群和特有菌群。

利用 LEfSe 软件^[15]在属水平基于 all-against-all 策略找到不同组别中具有显著丰度差异的菌属, 利用 R 语言的 stats 包和 python 的 scipy 包对上述菌属在不同民族学生样本间进行 Wilcoxon 秩和检验 (Wilcoxon rank-sum test), 使用 FDR 方法对 P 值进行多重检验校正, 评估物种丰度差异的显著性水平, 获得组间显著性差异物种。按照优势菌群线性判别分析(LDA), 找出对不同民族产生显著性差异影响的菌属, 结合 R 软件 RandomForest 包对所有样本进行随机森林(Random Forest)分析(决策树数量 500, 基于 AUC 验证), 挑选出对样本分类最为重要的菌属(biomarker)。

根据菌群在属水平上的相对丰度, 利用 R 语言 ade4 包、cluster 包和 clustersim 包, 计算 Jensen-Shannon Distance (JSD)距离, 并进行 PAM (Partitioning Around Medoids) 聚类, 通过 Calinski-Harabasz (CH)指数计算最佳聚类 K 值, 然后采用 PCoA ($K \geq 2$)进行可视化, 研究不同样本优势菌群结构的分型情况。利用 GGTERN (<http://www.ggtern.com/>)软件对优势菌群结构分型结果的物种组成进行三元相图比较分析。

原始测序数据集分别存放在 GenBank 和 NCBI Biological Research Project Data 项目登录号 PRJNA507100 和登录号 SAMN10484686-SAMN10484725 下。

2 结果和分析

2.1 志愿者信息与饮食习惯调查

问卷调查结果显示, 除志愿者年龄及 BMI 指

数外(P 值分别为 0.841 和 0.852), 其他各种食物的日常摄入量在两族志愿者间 P 值均小于 0.05, 表明年龄及 BMI 指数在两族志愿者间无显著差异, 而饮食情况在两族志愿者间存在显著性差异。

2.2 Alpha 多样性

对 40 个样品进行测序并对所得结果进行优化后, 共获得有效序列 4351243 条, 以 97% 的相似性共划分出 OTUs 2880 个, 测序覆盖率(coverage)均值为 99.39%。对两民族学生肠道细菌 alpha 多样性指数(表 1)的 Wilcoxon 检验结果显示, ACE 指数($P=0.008$)和 Chao 指数($P=0.049$)在两组间存在显著性差异($P<0.05$), Shannon 指数和 Simpson 指数在两组间差异不显著($P>0.05$), 说明不同民族学生肠道细菌的丰富度有显著不同, 而多样性无显著差异。稀释曲线趋向平坦(图 1), 说明测序数据

表 1. 不同民族学生肠道细菌 alpha 多样性指数

Table 1. Alpha diversity of gut bacteria of Tibetan and Han students

Estimators	ACE	Chao	Shannon	Simpson
Han	996.94±136.19	1002.90±140.31	4.30±0.44	0.04±0.02
Tibetan	1151.50±208.00	1132.70±243.32	4.42±0.53	0.04±0.02

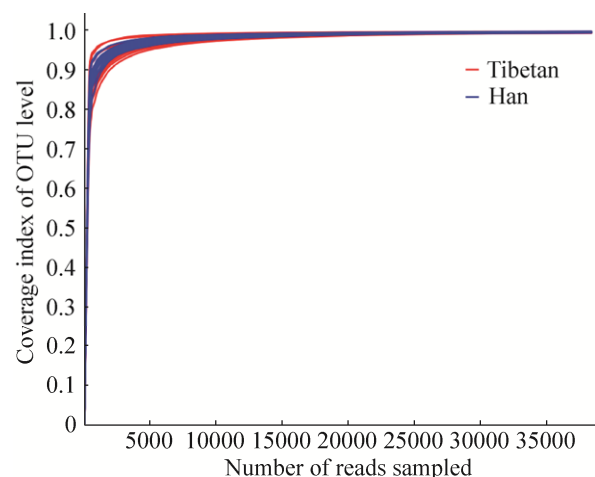


图 1. 样品中细菌群体的稀释曲线

Figure 1. Rarefaction curves of bacterial populations in samples.

量可以反映样本中菌群的多样性信息, 虽可能有少量细菌未被发现, 但现有序列已满足后续分析要求。

2.3 不同民族学生肠道细菌组成

通过与 Silva 数据库(<https://www.arb-silva.de/>)进行比对, 本次测序所得 OTUs 分属 21 个门、38 个纲、79 个目、136 科、387 个属的细菌。藏汉两族学生肠道细菌共有属为 232 个(图 2-A), 其中丰度大于 1% 的共有菌属为 18 个(图 2-B), 分别

属于以 *Firmicutes*、*Bacteroidetes*、*Proteobacter* 和 *Actinobacteria* 为主的 4 个菌门。藏汉两族的特有菌属丰度均 <1%, 藏族特有属有 36 种(图 2-C), 以 *Bacteroidetes* 门 *Prevotellaceae* 科下未分类属 (unclassified genus, 0.50%) 和 *Cyanobacteria* 门下 *Gastranaerophilales* 科无明确分类信息 (norank, 0.41%) 的菌属为主; 汉族特有属 62 种(图 2-D), 以 *Bacteroidetes* 门 *Chryseobacterium* 菌属 (0.49%) 和 *Actinobacteria* 门 *Kocuria* 菌属 (0.49%) 为主。

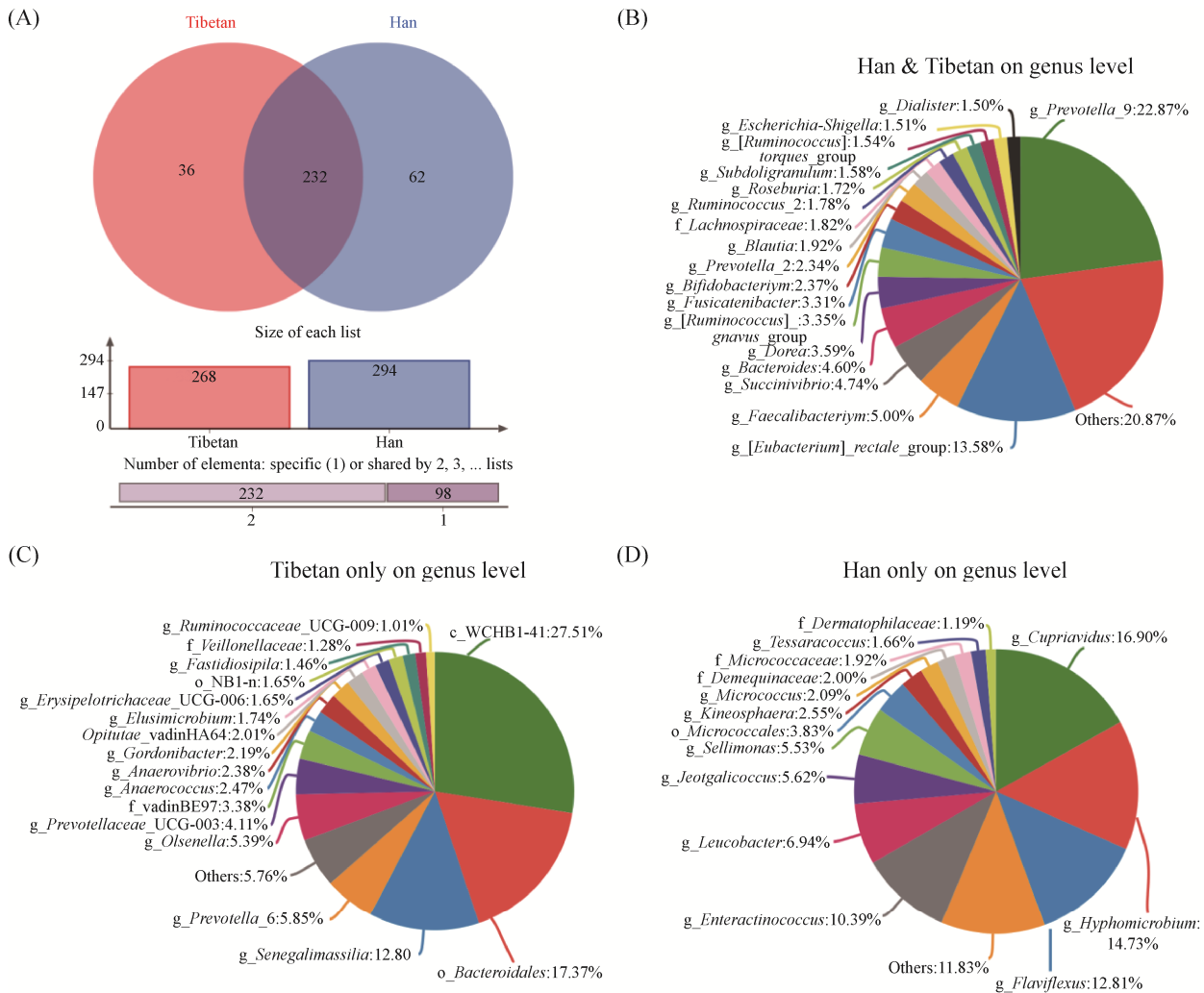


图 2. 基于属水平的不同民族学生肠道细菌组成分析

Figure 2. Composition analysis of gut bacteria of Tibetan and Han students at the genus level. A: Venn diagram; B: Common bacteria shared by both Han & Tibetan; C: Bacteria community only in Tibetan at genus level; D: Bacteria community only in Han on genus level.

2.4 Beta 多样性分析

PCoA 分析表明,大部分汉族学生样本聚集在一起且与藏族学生样本之间距离较大,而 H04、H06、H08、H09 和 H11 五个汉族学生的样本与藏族学生的样本聚集在一起(图 3-A),第 1 主成分的贡献率为 37.86%,第 2 主成分的贡献率为 12.72%。Anosim 分析显示 R 值为 0.416 ($P < 0.001$),说明组间差异明显大于组内差异,分组具有意义(图 3-B)。

2.5 不同民族学生肠道细菌差异

两组样本细菌群落门水平的结构柱形图(图 4-A)表明,藏族学生样本 *Firmicutes* 菌门含量占总量的 41.35%、*Bacteroidetes* 菌门占 45.39%、*Proteobacteria* 菌门占 10.51%、*Actinobacteria* 菌门占 1.90%;而

汉族学生样本中,*Firmicutes* 菌门含量在总量中高达 71.11%,*Bacteroidetes* 菌门和 *Proteobacteria* 菌门含量远低于藏族学生样本,分别为 19.01%和 4.82%,*Actinobacteria* 菌门含量为 4.57%,高于藏族学生样本。对两组样本进行 Wilcoxon 秩和检验的结果表明,在藏汉两族样本中共有且丰度大于 1%的 18 个菌属中,*Prevotella 9*、*Faecalibacterium*、*Succinivibrio* 等 12 个菌属在两组之间有显著性差异(图 4-B)。根据多级物种差异判别(LEfSe)分析(图 4-C),两组间丰度差异显著的物种,红色节点表示在藏族同学肠道菌群中起到重要作用的细菌类群,蓝色节点表示在汉族同学肠道菌群中起到重要作用的细菌类群。*Firmicutes* 菌门中的 *Veillonellaceae* 科、*Ruminococcaceae* 科 *Faecalibacterium* 属、*Bacteroidetes* 菌门中的 *Prevotella 9* 属和 *Prevotella 2* 属及 *Proteobacteria* 菌门 *Succinivibrio* 属对藏族同学肠道菌群结构组成起到重要作用。*Firmicutes* 菌门中的 *Dorea*、*Fusicatenibacter*、*Ruminococcus torques* group 和 *Ruminococcus gnavus* group 等菌属及 *Actinobacteria* 菌门对汉族同学肠道菌群结构组成起到重要作用,与两民族学生样本门水平的菌群丰度分布具有一致性。从随机森林分析(Random Forest)重要性排名在前 30 的导致藏汉两族学生肠道细菌结构差异的物种中(图 4-D),结合 LDA 打分结果(图 4-E),筛选出 LDA Score >3 的菌属(表 2),包括 *Prevotella 9*、*Faecalibacterium*、*Succinivibrio*、*Prevotella 2*、*Dorea*、*Ruminococcus gnavus* group、*Fusicatenibacter*、*Blautia*、*Ruminococcus torques* group 和 *Lachnospiraceae* 科的未分类属(unclassified genus)为对藏、汉两族学生肠道细菌样本组间差异具有显著性影响 10 个标志性(biomarker)菌属。

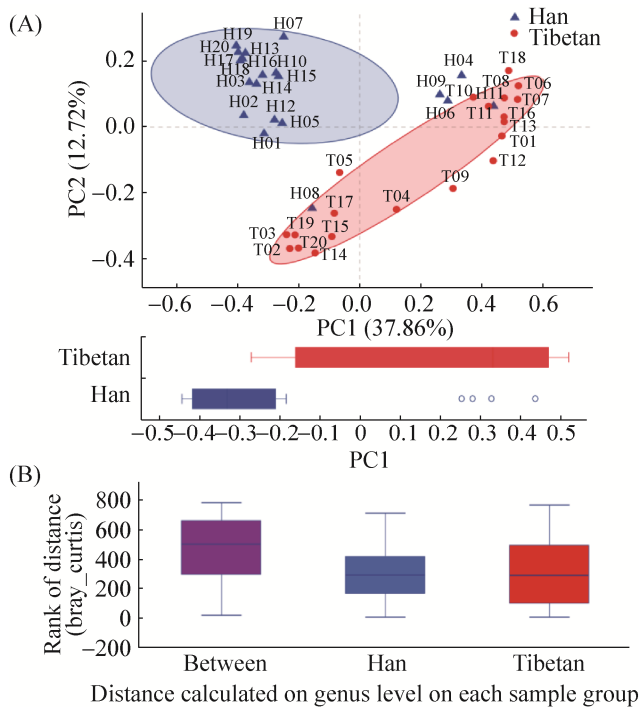


图 3. 不同民族学生肠道细菌的 beta 多样性比较
Figure 3. The beta diversity of bacterial populations between Tibetan and Han students. A: PCoA on genus level; B: Anosim_distances on genus level.

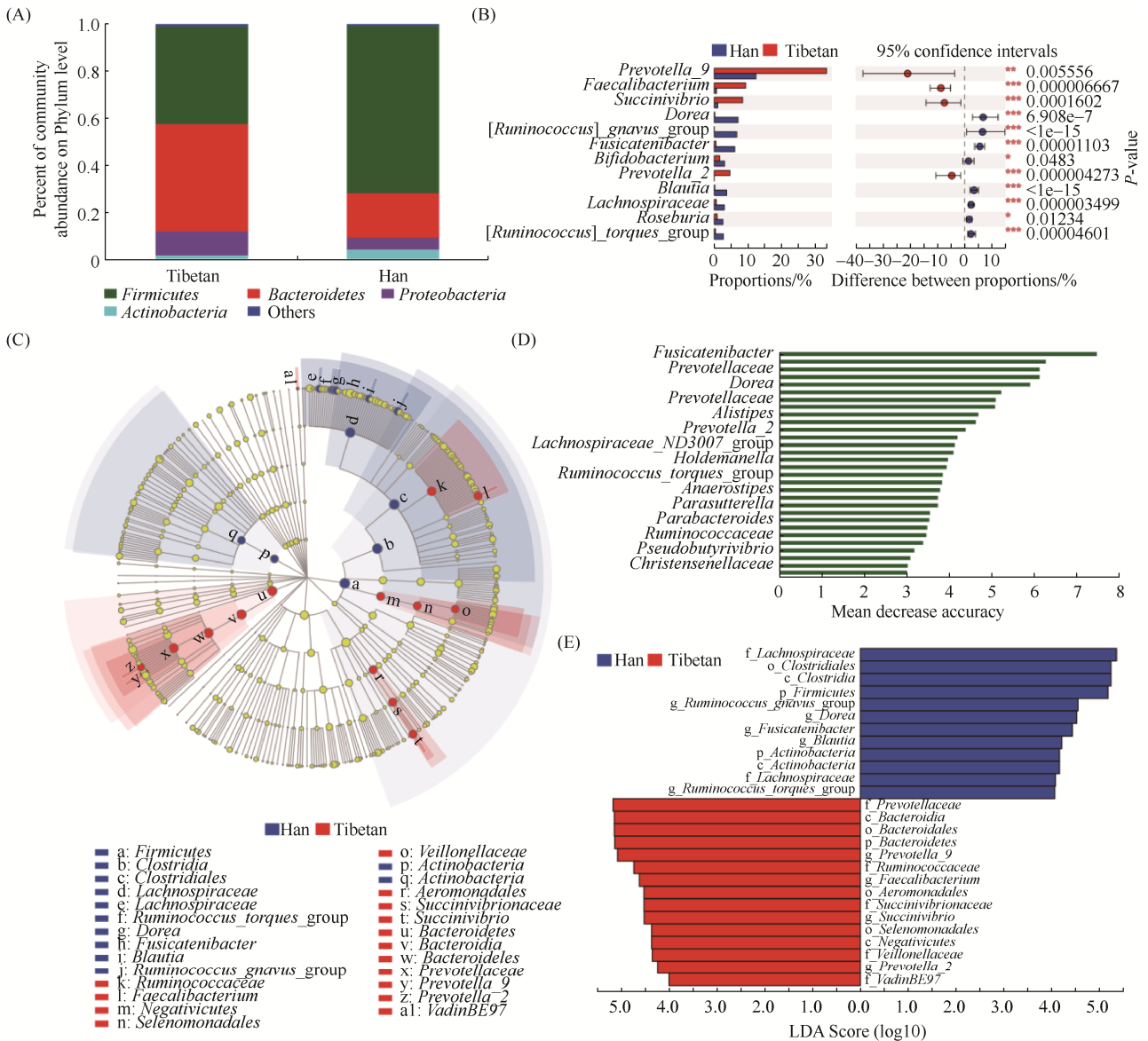


图 4. 不同民族学生肠道细菌的差异分析

Figure 4. Analysis of differences between Tibetan and Han students. A: Typing analysis on phylum level; B: Significance test between Tibetan and Han students based on Wilcoxon test; C: LefSe analysis on different levels with significant differences; D: Random Forest dotchart of variable importance on genus level; E: LDA bar on different levels with significant differences.

2.6 不同民族学生肠道细菌肠型

在属水平上的菌群分型结果表明，优势菌群结构近似的样本分别聚成三类(图 5-A)。汉族学生样本的主体形成 Type 1 类群，以藏族学生样本为主体分别形成 Type 2 和 Type 3 两个类群，其中 Type 1 类群和 Type 3 类群的距离更为接近，而

H04、H06、H09 和 H11 四个汉族学生样本与藏族学生 Type 2 类群聚在一起，汉族学生 H08 样本与藏族学生 Type 3 类群聚在一起。ANOSIM 分析显示 *R* 值为 0.884 ($P < 0.001$), 说明 Type 1、Type 2 和 Type 3 三个类群的组间差异大于组内差异，可以作为肠型分析的分组依据。

表 2. 物种差异分析结果

Table 2. Results of different genus analysis of two student cohorts

Genus name	Wilcoxon Rank-sum test			Random forest Importance	LEfSe analysis	
	Han	Tibetan	Corrected <i>P</i> value		LDA value	<i>P</i> value
<i>Prevotella 9</i>	12.36±24.54	33.28±30.67	0.01	6.29	5.08	<0.01
<i>Faecalibacterium</i>	0.66±1.25	9.33±9.33	<0.01	3.54	4.63	<0.01
<i>Succinivibrio</i>	1.04±4.61	8.42±13.86	<0.01	1.92	4.53	<0.01
<i>Dorea</i>	7.01±10.72	0.16±0.27	<0.01	5.92	4.53	<0.01
<i>Ruminococcus gnavus</i> group	6.67±16.63	0.02±0.03	<0.01	6.14	4.56	<0.01
<i>Fusicatenibacter</i>	6.11±4.26	0.51±0.65	<0.01	7.50	4.44	<0.01
<i>Prevotella 2</i>	0.01±0.01	4.66±11.94	<0.01	4.38	4.25	<0.01
<i>Blautia</i>	3.67±3.62	0.16±0.19	<0.01	5.09	4.22	<0.01
<i>Lachnospiraceae</i> unclassified genus	3.03±1.74	0.61±0.56	<0.01	3.00	4.09	<0.01
<i>Ruminococcus torques</i> group	2.74±3.26	0.34±0.36	<0.01	3.84	4.07	<0.01

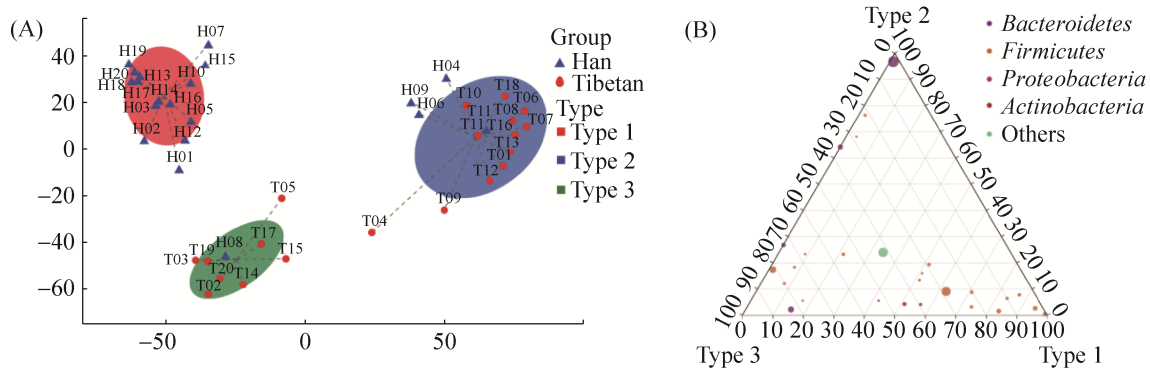


图 5. 不同民族学生肠道细菌的肠型分析

Figure 5. Enterotype Analysis between Tibetan and Han students. A: Typing analysis on Genus level; B: Ternary Plot of enterotypes.

结合三元相图分析不同菌属在样本中的比重和关系发现,对丰度小于 0.01 的物种进行合并后,以 *Ruminococcus*、*Dorea* 和 *Eubacterium* 为代表的 *Firmicutes* 菌门在 Type 1 类型的汉族学生样本中占比较重,以 *Prevotella 9* 为代表的 *Bacteroidetes* 菌门在以藏族学生为主的 Type 2 类型样本中占比较重,而 *Firmicutes* 菌门中的 *Faecalibacterium* 和 *Bacteroidetes* 菌门中的 *Bacteroides* 对于以藏族学生为主的 Type 3 类型样本的贡献十分接近(图 5-B)。因此,根据 Arumugam 等^[16]对肠型(enterotypes)特征的划分,Type 1 类群表现为 ET F

肠型,Type 2 类群表现为 ET P 肠型,Type 3 类群表现为 ET F 和 ET B 混合肠型。

3 讨论

人体肠道菌群的结构是维持宿主健康的必要条件,而菌群的结构与宿主的民族、健康状况、饮食结构、生活环境等诸多内外因素相关。发表在 Cell 上的一项研究发现同族裔人群移民后会引起肠道菌群向着促代谢疾病的方向发生显著改变,说明肠道微生物与种群和生活环境均有一定

关联^[4]。对在尼日利亚乡村和城市生活的人群肠道微生物群进行比较的研究表明,不同生活环境的成年人肠道微生物存在很多差异^[5]。然而,在相同环境下生活超过3个月以上的时间,由于饮食习惯的改变,肠道菌群的组成和丰度也会发生相应改变,也就是,饮食干预会导致肠型发生改变^[16-17]。生活在青藏高原的藏族人群,生活环境海拔梯度较大,不同地域的饮食习惯也有很大差异。之前有研究显示,生活在不同海拔^[18]、不同生活环境(城市和农村)^[19]的藏族人群肠道菌群多样性有一定差异,但上述研究中没有排除年龄、性别、体脂比等其他因素的影响。

本研究所有样品都来自生活于相同环境中的健康藏族和汉族学生,其中主要的不同是遗传(民族)背景和饮食习惯。研究结果显示,健康藏族学生与汉族学生肠道细菌结构多样性具有一定差异,问卷调查显示两族学生在饮食习惯上有所差异。就汉族学生而言,大部分汉族学生 Type 1 类群肠道细菌结构表现出 ET F 型肠型,在其代表菌属中,有研究表明 *Ruminococcus*、*Dorea* 和 *Eubacterium* 菌属是人类肠道中降解淀粉和纤维素的关键菌,以及产生丁酸盐的主要细菌,在维持肠道内环境稳定方面发挥着关键作用^[20-22]。*Eubacterium* 菌属含有 40 余种与降解淀粉有关的基因^[23],能够分解多糖产生丁酸等短链脂肪酸^[24]。Type 1 类群的汉族学生基本来自甘肃、河南、山东等农村,其 ET F 型肠道菌群结构与他们日常饮食习惯中碳水化合物及果蔬摄入较多有关。而 H08 样本的汉族学生自从祖辈起就生活在西藏且出生在西藏,成长过程中在拉萨附近农区生活且有相应的饮食习惯,并表现出与 Type 3 类群藏族学生相似的菌群结构。H04、H06、H09 和 H11 样本的汉族学生与来自牧区的藏族学生生活在同一

宿舍,受到藏族同学饮食习惯的影响,日常也喜欢食用酥油茶、风干牦牛肉等,并表现出与 Type 2 类群藏族学生肠道菌群组成更近似的现象。由此可以看出,汉族学生群体的肠道微生物组成特征及分型直接与其饮食习惯的保持和改变密切相关。

同样,所有藏族学生的肠道微生物组成也分成两个类型,其中表现为 ET P 肠型的 Type 2 类群藏族学生主要来自牧区,自幼饮食习惯以肉类为主,果蔬摄入量较少,在校期间依然保留每天喝酥油茶、吃奶渣和风干牦牛肉等传统的饮食习惯,脂肪及蛋白质摄入量高于其他学生,因此肠道中与分解蛋白质和饱和脂肪酸相关、具有合成维生素 B1 及叶酸能力的 *Prevotella* 菌属^[25]细菌较多。表现为 ET F 和 ET B 混合肠型的 Type 3 类群藏族学生多来自日喀则及拉萨周边等地农区,饮食习惯以糌粑等碳水化合物为主,与汉族学生的饮食习惯相似,但肉蛋及果蔬类摄入量略少,因此肠道内分解植物纤维素的 *Faecalibacterium* 菌属和能够富集碳水化合物代谢酶、提高宿主营养利用率的 *Bacteroides* 菌属^[26-27]占据优势。因此,藏族学生群体肠道微生物组成特征和分型也是和他们传统的饮食习惯直接相关。

整体而言,汉族学生的肠道细菌类型分为 3 种,藏族学生分为 2 种,在各自遗传背景相对一致的情况下,不同的饮食习惯导致了各自群体内部的这种差别。同时,大多数汉族学生与藏族学生的肠道细菌的丰富度及多样性均有差异,牧区的藏族学生并没有出现 Type 1 类群的 ET F 肠型,这种差异整体上可能与调查样本中的藏族学生更倾向于保持传统的饮食习惯有关。不过,这还需要扩大样本的进一步研究来证实。另外,藏族饮食中的奶渣为发酵食品,风干牦牛肉、酥油在制作过程中长期与环境微生物接触,这些食品中的微生物

物是否对藏族学生的核心菌群构建及汉族学生肠道菌群的变化起到影响也是未来需要进一步研究的内容。

参考文献

- [1] D'Argenio V, Salvatore F. The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clinica Chimica Acta*, 2015, 451: 97–102.
- [2] The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 2012, 486(7402): 207–214.
- [3] [3] Cénit MC, Matzaraki V, Tigchelaar EF, Zhernakova A. Rapidly expanding knowledge on the role of the gut microbiome in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2014, 1842(10): 1981–1992.
- [4] Vangay P, Johnson AJ, Ward TL, Al-Ghalith GA, Shields-Cutler RR, Hillmann BM, Lucas SK, Beura LK, Thompson EA, Till LM, Batres R, Paw B, Pergament SL, Saenyakul P, Xiong M, Kim AD, Kim G, Masopust D, Martens EC, Angkurawanon C, McGready R, Kashyap PC, Culhane-Pera KA, Knights D. US immigration westernizes the human gut microbiome. *Cell*, 2018, 175(4): 962–972.e10.
- [5] Ayeni FA, Biagi E, Rampelli S, Fiori J, Soverini M, Audu HJ, Cristino S, Caporali L, Schnorr SL, Carelli V, Brigidi P, Candela M, Turrone S. Infant and adult gut microbiome and metabolome in rural Bassa and urban Settlers from Nigeria. *Cell Reports*, 2018, 23(10): 3056–3067.
- [6] Zhang JC. Mongolians core gut microbiota and its correlation with dietary changes. Doctor Dissertation of Inner Mongolia Agricultural University, 2014. (in Chinese)
张家超. 蒙古族肠道核心菌群及其与饮食关联性研究. 内蒙古农业大学博士学位论文, 2014.
- [7] AbuLaiti Z. Study on the difference of intestinal flora between Chinese and Uygur patients with breast cancer and normal women. Master Dissertation of Xinjiang Medical University, 2017. (in Chinese)
孜白旦·阿不来提. 汉族、维吾尔族乳腺癌患者与健康对照肠道菌群差异性研究. 新疆医科大学硕士学位论文, 2017.
- [8] Peng QN, Huo DX, Xu CB, Hu QS, Zhang JC. Intestinal microbiota in Li cohort and its correlation with their diets. *Microbiology China*, 2017, 44(11): 2624–2633. (in Chinese)
彭情楠, 霍冬雪, 徐传标, 胡淇淞, 张家超. 黎族人肠道微生物群落结构特征及其与饮食关联性. 微生物学通报, 2017, 44(11): 2624–2633.
- [9] Zheng Y, Zhang JC, Qiao JM, Huo DX, Huang WQ, Hou QC, Zhang HP. The diversity of gut microbiota of Zhuang ethnic group living in urban and rural. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2016, 16(1): 226–236. (in Chinese)
郑艺, 张家超, 乔健敏, 霍东雪, 黄卫强, 侯强川, 张和平. 壮族人群肠道菌群多样性分析. 中国食品学报, 2016, 16(1): 226–236.
- [10] 彭海玲. 佤族与汉族人群肠道微生物菌落结构和组分的分化. 昆明理工大学硕士学位论文, 2016.
- [11] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335–336.
- [12] Edgar RC. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996–998.
- [13] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(D1): D590–D596.
- [14] Schloss PD, Gevers D, Westcott SL. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *PLoS One*, 2011, 6(12): e27310.
- [15] Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 2011, 12(6): R60.
- [16] Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan

- M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin JJ, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Doré J, MetaHIT Consortium, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 2011, 473(7346): 174–180.
- [17] Costea PI, Hildebrand F, Arumugam M, Bäckhed F, Blaser MJ, Bushman FD, De Vos WM, Ehrlich SD, Fraser CM, Hattori M, Huttenhower C, Jeffery IB, Knights D, Lewis JD, Ley RE, Ochman H, O'Toole PW, Quince C, Relman DA, Shanahan F, Sunagawa S, Wang J, Weinstock GM, Wu GD, Zeller G, Zhao LP, Raes J, Knight R, Bork P. Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nature Microbiology*, 2018, 3(1): 8–16.
- [18] Li K, Dan Z, Gesang LB, Wang H, Zhou YJ, Du YL, Ren Y, Shi YX, Nie YQ. Comparative analysis of gut microbiota of native Tibetan and Han populations living at different altitudes. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0155863.
- [19] Li H, Li TT, Li XZ, Wang GH, Lin Q, Qu JP. Gut microbiota in Tibetan herdsmen reflects the degree of urbanization. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1745.
- [20] Ze XL, Duncan SH, Louis P, Flint HJ. *Ruminococcus bromii* is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon. *The ISME Journal*, 2012, 6(8): 1535–1543.
- [21] Chassard C, Delmas E, Robert C, Lawson PA, Bernalier-Donadille A. *Ruminococcus champanellensis* sp. nov., a cellulose-degrading bacterium from human gut microbiota. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62: 138–143.
- [22] Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2008, 27(2): 104–119.
- [23] Sonnenburg JL, Xu J, Leip DD, Chen CH, Westover BP, Weatherford J, Buhler JD, Gordon JI. Glycan foraging *in vivo* by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science*, 2005, 307(5717): 1955–1959.
- [24] Louis P, Young P, Holtrop G, Flint HJ. Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA: acetate CoA-transferase gene. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(2): 304–314.
- [25] Johnson EL, Heaver SL, Walters WA, Ley RE. Microbiome and metabolic disease: revisiting the bacterial phylum Bacteroidetes. *Journal of Molecular Medicine*, 2017, 95(1): 1–8.
- [26] Berry D. The emerging view of *Firmicutes* as key fibre degraders in the human gut. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(7): 2081–2083.
- [27] Marchesi JR, Adams DH, Fava F, Hermes GD, 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.

Gut bacterial community diversity in healthy Tibetan and Han college students

Yixuan Liu^{1,2}, Pengxi Cao¹, Hongmei Ma¹, Xing Liu^{1,2,3*}

¹ College of Sciences, Tibet University, Lhasa 850000, Tibet Autonomous Region, China

² Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota to Extreme Environments, Research Center for Ecology and Environment of Qinghai-Tibetan Plateau, Tibet University, Lhasa 850000, Tibet Autonomous Region, China

³ College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, Hubei Province, China

Abstract: **[Objective]** To understand the diversity characteristics and possible causes of gut bacterial composition of healthy Tibetan and Han population in the same age group living in the same environment. **[Methods]** Healthy male students including 20 Tibetan and 20 Han aged 20–24 in the same major of the same campus volunteered for this study. Total DNA was extracted from fresh feces collected at the same day from male healthy Tibetan and Han students in the same grade. The V3–V4 region of 16S rRNA were amplified by PCR then sequenced on Illumina MiSeq platform. The sequencing results were analyzed with bioinformatic softwares combined with Dietary status questionnaire to study the relationship between gut bacterial diversity and dietary habits of healthy Tibetan and Han students. **[Results]** A total of 2880 OTUs were obtained from 40 samples. Alpha and beta diversity analysis showed that male students from different ethnic groups had significantly different gut bacterial compositions under the same environment. *Prevotella 9*, *Bacteroides*, *Lachnoclostridium* and other 15 genera are shared by both Tibetan and Han students. Meanwhile, the composition and abundance of 10 genera, such as *Prevotella 9*, *Faecalibacterium*, *Succinivibrio* etc., are the biomarkers that have significant influence on the difference of intestinal bacteria composition between the two ethnic students. Further cluster analysis showed that all the student samples were divided into three enterotypes: ET F, ET P, mixed ET F and ET B. The follow-up survey results showed that different enterotypes corresponded to different dietary habits based on fat and starch. **[Conclusion]** Living in the same environment, the composition and differences of gut bacteria of healthy Tibetan and Han students may be closely related to genetic factors and dietary habits.

Keywords: gut microbiome, diversity, 16S rRNA, enterotypes, dietary habits

(本文责编: 李磊)

Supported by the Natural Science Foundation of Tibet Autonomous Region, China (2016ZR-TU-04) and by the Tibet University 2019 Central Financial Support Special Funds for Local Colleges and Universities (2019 No. 01)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-27-68753780; E-mail: xingliu@whu.edu.cn

Received: 11 January 2019; Revised: 31 March 2019; Published online: 6 June 2019



刘星, 博士, 武汉大学生命科学学院生态学系教授, 博士生导师。主要从事极端环境生物适应与进化、生物多样性保护与资源利用、环境生态等领域的研究, 重点关注青藏高原极端环境微生物多样性及其与植物和动物的协同进化关系、藏药生物资源保护与利用等方向。目前在西藏大学援藏, 任理学院副院长, 分管学科、研究生和受援, 主持推动生态学进入世界一流学科建设行列, 并作为负责人, 创建“生态学教师团队”, 入选教育部首批“全国高校黄大年式教师团队”。兼任 IUCN-SSC 委员会委员, 《环境生态》编委等。主持国家自然科学基金面上项目 2 项、地区基金项目 1 项; 主持湖北省自然科学基金面上项目 1 项; 主持科技横向项目 2 项; 参与的国家科技计划重大基础专项 1 项; 获得西藏大学“高原学者”人才项目支持。发表学术论文 50 余篇, 其中 SCI 论文 20 余篇。