

研究报告



共生表皮葡萄球菌促进果蝇胚后发育

刘威^{Δ*1} 王晓阳^{Δ2} 高晓春³

1 山西医科大学汾阳学院医学检验系 山西 汾阳 032200

2 山西医科大学汾阳学院临床医学系 山西 汾阳 032200

3 山西省汾阳医院 山西 汾阳 032200

摘要:【背景】动物体定殖有多种共生微生物,这些共生微生物严重影响着宿主生理和病理,日益成为研究热点之一。【目的】分离与鉴定黑腹果蝇共生菌,探究表皮葡萄球菌对黑腹果蝇的发育影响和潜在作用机制。【方法】用 CEM 培养基(Carotenoid expression medium)从果蝇肠道内分离细菌,通过 16S rRNA 基因序列比对鉴定菌株;以发育时间和幼虫表面积检测果蝇的发育时期和生长速率;利用实时定量 PCR 检测果蝇促前胸腺激素与胰岛素通路的激活。【结果】从果蝇体内分离到的菌株为表皮葡萄球菌,该菌可以有效定殖于果蝇的肠道。表皮葡萄球菌通过提高果蝇生长速率而显著促进其发育。在分子水平上,表皮葡萄球菌激活 *PTTH* 和胰岛素信号以刺激宿主的生长发育。【结论】表皮葡萄球菌是果蝇的一种共生菌,可以通过调控 *PTTH* 和胰岛素信号而刺激果蝇生长发育。

关键词: 表皮葡萄球菌,黑腹果蝇,发育,生长速率,共生菌

Commensal *Staphylococcus epidermidis* promoted postembryonic development of *Drosophila melanogaster*

LIU Wei^{Δ*1} WANG Xiao-Yang^{Δ2} GAO Xiao-Chun³

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

2 Department of Clinical Medical, Fenyang College, Shanxi Medical University, Fenyang, Shanxi 032200, China

3 Shanxi Fenyang Hospital, Fenyang, Shanxi 032200, China

Abstract: [Background] Animals harbor many microbial species that exert profound effects on host physiology and pathology, currently emerging as one of investigational hotspots. [Objective] To explore *Staphylococcus epidermidis* effects on the developmental timing of *Drosophila melanogaster*. [Methods] The bacteria were isolated from the fly guts by carotenoid expression medium (CEM), and the bacterial species were further determined by using 16S rRNA gene sequence. The growth and development of flies were detected. Real-time quantitative PCR was used to detect the activation of the prothoracicotropic

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31501175); Key Fund of Science and Technology Development of Fenyang College of Shanxi Medical University (2018C02)

ΔThese authors equally contributed to this work

*Corresponding author: Tel: 86-358-2100769; E-mail: liuwei@sxmu.edu.cn

Received: 17-07-2018; Accepted: 05-11-2018; Published online: 13-11-2018

基金项目: 国家自然科学基金(31501175); 山西医科大学汾阳学院科技发展重点基金(2018C02)

Δ对本文贡献相同

*通信作者: Tel: 0358-2100769; E-mail: liuwei@sxmu.edu.cn

收稿日期: 2018-07-17; 接受日期: 2018-11-05; 网络首发日期: 2018-11-13

hormone (*PTTH*) and insulin pathway in flies. **[Results]** The isolated strain was identified as *S. epidermis*, which was able to effectively colonize in the guts of flies. *S. epidermis* accelerated the development of *D. melanogaster* by promoting the growth rate. At the molecular level, *S. epidermis* activated *PTTH* and insulin signals to stimulate the growth of hosts. **[Conclusion]** *S. epidermis* was a commensal bacterium of flies, which stimulated the growth and development of flies by regulating *PTTH* and insulin signals.

Keywords: *Staphylococcus epidermidis*, *Drosophila melanogaster*, Development, Growth rate, Commensal bacteria

包括昆虫和人类在内后生生物的肠道栖息着大量微生物, 其中主要包括细菌、真菌和病毒, 这些微生物与宿主之间形成了共生关系, 能够帮助宿主提高免疫和增强代谢, 有利于神经系统发育。哺乳动物的胃肠道为微生物提供了丰富营养和适宜的温度和 pH 值, 而微生物组则使后生生物在适应和进化过程中受益^[1]。所以, 动物的表型是在宿主基因组和微生物组的共同作用下形成的。人类微生物组是基因多样性的自然来源, 其基因数量是人类基因的 150 倍, 并且人类微生物组作为一个整体影响人的表型^[2], 但是微生物组作为人体基因的重要组成部分却常常被忽略。传统上, 宿主表现型是在相对微生物群的环境下进行评估的, 微生物群的影响很少被关注。由于基因的多样性, 微生物通过降解不可消化的碳水化合物、产生短链脂肪酸和维生素、抑制病原体的感染等方式影响宿主的生理机能^[3-4]。此外, 肠道微生物还可维持疾病与健康之间的平衡, 包括腹泻、糖尿病、情绪障碍、动脉粥样硬化等均与肠道微生物有关^[5]。共生关系对于研究人类健康、生态和遗传变异是必不可少的, 但由于微生物的多样性和复杂性, 其深入的机制还有待于进一步的研究。

葡萄球菌最初被发现于脓液中, 但也是人类和其他哺乳动物皮肤黏膜的常见菌^[6]。根据分类学标准, 葡萄球菌可分为金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 和腐生葡萄球菌 (*Staphylococcus saparophytis*) 3 种。其中表皮葡萄球菌是最常见于人类体表的一种革兰阳性球菌, 主要定植于腋窝、头部、鼻孔和肠道^[7]。在生物界,

表皮葡萄球菌扮演着多种角色。对于人而言, 表皮葡萄球菌是一种常见的人体皮肤共生菌, 几乎存在于健康人体每个部位, 与人保持共生关系。表皮葡萄球菌的有益作用表现为可抑制致病性金黄色葡萄球菌的定殖能力。表皮葡萄球菌可分泌丝氨酸蛋白酶 Esp, 抑制金黄色葡萄球菌的生物膜形成和定殖^[8]。同时, 它还可以产生一种具有杀菌活性的蛋白质化合物——细菌素, 以限制病原菌的定殖^[9-10]。表皮葡萄球菌不仅存在于人体体表, 而且能够进入某些体腔。例如, 葡萄球菌是人类鼻腔中具有支配地位的共生细菌。可以推测, 通过取食和呼吸等, 葡萄球菌可以进入口腔和消化道, 所以葡萄球菌也出现在多种动物消化道内。鉴于果蝇经常采食环境中食物, 所以表皮葡萄球菌可能作为腐生动物的一种肠道共生菌。除此之外, 基因组分析结果表明, 表皮葡萄球菌含有大量的基因, 能够保护定殖环境免受损坏, 并逃逸宿主的免疫反应^[11-12]。总之, 葡萄球菌在大多数情况下与宿主形成了密切的共生关系。

近年来, 随着肠道微生物研究的兴起, 果蝇以其易饲养、繁殖周期短、易建立无菌和悉菌果蝇模型、肠道结构与人类相似和菌群高度保守等优点, 成为研究微生物与宿主关系的热点模型。在自然界, 果蝇多以腐烂的水果为食, 而腐烂的食物常常含有多种微生物, 这就意味着果蝇不可避免地会接触到微生物, 从而不断补充肠道菌群。本次实验尝试使用 CEM 培养基 (Carotenoid expression medium) 从野生果蝇肠道内分离葡萄球菌, 最终分离得到一株表皮葡萄球菌, 进一步研究了该菌对果蝇生长发

育的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用菌株表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)为本实验室分离、鉴定和保存。

次氯酸钠、Triton, Sigma 公司; 多聚甲醛, Merck 公司; Taq 酶、RT-PCR 试剂盒, TaKaRa 公司; 兔源一抗 PH3, Millipore 公司; 抗兔二抗-568、反转录试剂盒、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)、Trizol, Invitrogen 公司。实时定量 PCR 仪, Bio-Rad 公司; 分光光度仪, 岛津公司; 厌氧装置系统和冷冻离心机, 上海力申公司。基因测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

酵母玉米培养基(g/L): 琼脂 13.00, 氯化钙 0.83, 蔗糖 31.60, 葡萄糖 63.20, 玉米粉 77.70, 酵母浸出粉 24.00, 双蒸水 1.35 L。CEM 培养基(g/L): 蛋白胨 10.00, 牛肉膏 10.00, 盐酸半胱氨酸 0.50, 乙酸钠 3.00, 酵母浸出粉 3.00, 葡萄糖 5.00, 氯化钠 5.00, 可溶性淀粉 1.00, 琼脂 0.50, 双蒸水 1 L。

1.2 果蝇品系和饲养

实验用野生型果蝇品系为 Oregon R, 来源于中国科学院遗传与发育生物学研究所张永清课题组。果蝇在 25 °C、50%湿度、12 L:12 D 的光照周期条件下培养。如无特殊说明, 果蝇常规饲养食物为标准的酵母玉米培养基。

1.3 细菌的分离和鉴定

解剖取出 10 只野生型果蝇的肠道, 浸于磷酸盐缓冲液中 30 min, 然后用 75%的乙醇清洗 3 次, 再用磷酸盐缓冲液清洗 3 次, 最后加入 100 μ L 磷酸盐缓冲液并研磨。将研磨液稀释到 10^{-5} – 10^{-7} , 均匀涂布于 CEM 培养基, 37 °C 培养过夜, 挑出单菌克隆并纯化一次。热裂解法提取细菌的 DNA^[13], 利用 16S rRNA 基因通用引物(上游引物 8f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 下游引物 1510r: 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')进行 PCR 扩增^[14]。PCR 扩增产物送去测序。将测得的 16S

rRNA 基因序列提交到 GenBank 并获得登录号。利用 MEGA 5.2 制作进化树并分析其同源性。

1.4 常规果蝇、无菌果蝇和悉菌果蝇模型的建立

把表层中央涂有酵母的葡萄汁板置于收集器底部, 将羽化 4 d 内的果蝇收集至该收集器, 饲养过夜。将 8 h 之内的卵收集到 EP 管中, 依次使用 Walch 消毒液消毒 3 次、次氯酸钠消毒 1 次, 75%乙醇消毒 2 次, 每次时长 1 min, 即可获得无菌卵。然后将其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 OD_{580} 为 1.0 (约 10^8 CFU)的单株菌或者混合菌, 建立悉菌果蝇模型。在无菌体系基础上, 于第 2 天在果蝇培养基中加入 OD_{580} 为 1.0 (约 10^8 CFU)的常规饲养的 Oregon R 果蝇肠道研磨液, 建立常规果蝇模型(Conventional reared, CR)。

1.5 表皮葡萄球菌在果蝇体内的定殖

建立表皮葡萄球菌的悉菌果蝇模型, 用 4%酵母浓度的食物饲养。分别取 3 龄幼虫、蛹、成虫果蝇各 6 只, 用 75%的乙醇消毒 2 遍后, 加入 200 μ L 磷酸盐缓冲液研磨, 取 100 μ L 稀释至 10^{-3} – 10^{-7} 后, 取 100 μ L 的稀释液涂布到 CEM 固体培养基, 计数果蝇体内菌落数。取相应龄期的果蝇食物 100 mg, 加入 1 mL 磷酸盐缓冲液稀释并研磨, 涂板计数法统计果蝇食物中的菌落数目。

1.6 果蝇生长速率和发育历期测定

分别用 0.25%、0.5%、1.0%酵母浓度的培养基建立 CR、GF 和悉菌果蝇模型, 每日记录成蛹和羽化成虫的数量(以总量 30 只为标准), 分别计算成蛹和羽化成虫的时间(即发育历期)。利用公式如下:
$$T = (T_1 \times N_1 + T_2 \times N_2 + \dots + T_m \times N_m) / (N_1 + N_2 + \dots + N_m)$$
 T 代表发育历期, T_m 代表从卵产生到蛹形成或成虫形成所需要的时间, N_m 代表第 m 天出现的蛹或者成虫的数量。同样的方法, 分别用 0.5%、2.0%酵母浓度的培养基建立 CR、GF 和悉菌果蝇模型, 每日随机取 10 只果蝇幼虫置于载玻片上, 放入 -20 °C 冰箱速冻 2 h 后, 在显微镜下拍照, 用 ImageJ 软件计算体表面积。

1.7 实时定量 PCR

用 0.5%酵母浓度的培养基建立 CR、GF 和悉菌果蝇模型,从 3 d 幼虫到蛹形成后 3 d,每天随机挑取 10 只果蝇,用 Trizol 法提取总 RNA,以 2 mg 的 RNA 为模板,利用 Oligo-dT 引物反转录成 mRNA,并合成 cDNA^[15]。以合成的 cDNA 为模板,分别用相应引物检测 *PTTH* 和 *InR* 的转录水平(引物序列见表 1),以 *rp49* 作为参照基因,分别计算两者的相对表达量,计算公式如下: $\Delta C_t = C_t$ (目的基因) - C_t (参照基因), 相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

1.8 数据分析

表皮葡萄球菌在果蝇体内的定殖实验,果蝇生长速率和发育历期测定实验,实时定量 PCR 实验,均重复至少 3 次,以每组数据的平均值进行数据统计,采用方差分析(ANOVA)或者 *t* 检验(*t*-test)进行分析。

2 结果与分析

2.1 细菌的分离与鉴定

用 CEM 培养基从野外捕获的黑腹果蝇体内分离出一株细菌,该菌可在琼脂平板上形成不透明圆形凸起、表面光滑、边缘整齐的菌落。形态学鉴定为革兰阳性球菌,该菌成葡萄状聚集,无鞭毛和荚膜,与葡萄球菌的形态特征类似。该菌生理生化实验结果为:可分解葡萄糖、麦芽糖和蔗糖,不能分解甘露醇和乙醇,产酸不产气。为了进一步探究该菌的系统发育和生物学分类,提取细菌基因组 DNA,并利用 16S rRNA 基因的通用引物 8f 和 1510r 扩增该基因,测序获得 16S rRNA 基因序列长度为 1 460 bp。

在 GenBank 上进行序列比对,该菌与 *Staphylococcus epidermidis* 亲缘关系最近,因此将该菌命名为 *Staphylococcus epidermidis* FY, 登录号为 MH546126。图 1 为该细菌与相关细菌和常见肠道菌的进化树,菌株 FY 与 *Staphylococcus epidermidis* strain H44 (KU922314.1)相似性最高,相似性达 99.5% (1 432/1 439)。与同属的金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* strain FFL34 (JN092619.1)、*Staphylococcus aureus* strain S33 R (NR037007.2)和腐生葡萄球菌 *Staphylococcus saprophyticus* strain 3m-14 (JX188023.1)、*Staphylococcus saprophyticus* strain ATCC 15305 (NR074999.2)的相似性也较高,说明其亲缘关系很近。与肠道益生菌乳酸菌 *Leuconostoc pseudomesenteroides* (LC223100.1)、*Lactococcus lactis* strain FY (MF281053)亲缘关系较近,暗示该菌可能是一种肠道共生菌。但与一些常见的肠道杆菌(如大肠杆菌、蜂房哈夫尼菌)亲缘关系较远,这显示了果蝇肠道菌群的多样性和复杂性。

表 1 实时定量 PCR 的引物
Table 1 Primers used for real-time quantitative PCR analysis

Genes name	Primers sequence (5'→3')
<i>PTTH</i>	CACTCCACATCCCACAGAGATGGCGATGG CCACGAGCTCATTCGTAACCTTTGC
<i>InR</i>	AACAGTGGCGGATTCGGTT TACTCGGAGCATTGGAGGCAT
<i>rp49</i>	GACGCTTCAAGGGACAGTATCTG AAACGCGGTTTCAGCATGA

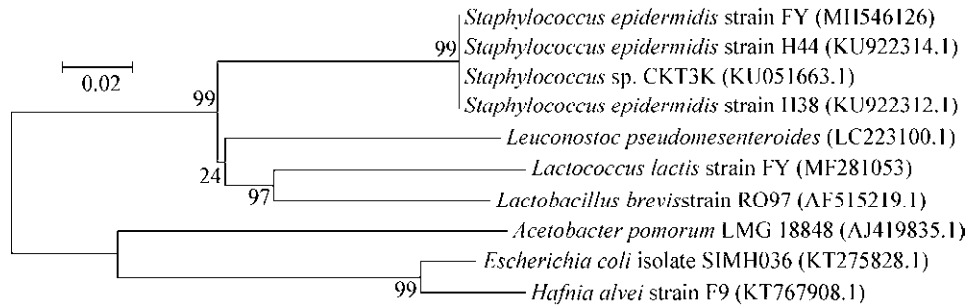


图 1 表皮葡萄球菌与其相关细菌基于 16S rRNA 基因序列的系统进化树
Figure 1 Phylogenetic tree of *S. epidermidis* and relatives based on 16S rRNA gene sequence

注: 标尺: 序列差异的分支长度; 标注的数字代表引导百分比; 括号内为 GenBank 登录号。
Note: Bar: Nucleotide divergence; Number at notes present bootstrap percentages; Those numbers in parentheses are GenBank accession number.

2.2 表皮葡萄球菌可在果蝇体内定殖

如图 2A 所示, 在 3 龄幼虫和蛹期, 果蝇体内表皮葡萄球菌的载菌量超过了 10^5 CFU, 在成虫期的载菌量则接近 10^6 CFU, 载菌量超过了已知的果蝇共生菌乳植杆菌(*Lactobacillus plantarum*)^[16], 这说明表皮葡萄球菌可以和乳植杆菌一样有效地定殖在果蝇肠道。为了进一步证明表皮葡萄球菌是黑腹果蝇的共生菌, 检测了果蝇食物的载菌量。如图 2B 所示, 在 3 龄幼虫、蛹和成虫期, 每克果蝇食物中表皮葡萄球菌的含量均达到了 10^9 CFU, 也高于乳植杆菌在食物中的量, 说明表皮葡萄球菌能够稳定存在于果蝇食物中。以上结果表明, 表皮葡萄球菌为黑腹果蝇的共生菌, 与其宿主有着紧密的联系。

2.3 表皮葡萄球菌加速果蝇的生长发育

果蝇发育到不同阶段所需要的时间是衡量果蝇生长状况的重要指标, 该指标同时受到食物中营养成分的影响。表皮葡萄球菌是果蝇的共生菌, 它对果蝇发育的影响如图 3A 所示。随着食物中酵母浓度的增加, 果蝇成蛹时间明显缩短, 这表明酵母

浓度影响果蝇的生长发育, 高酵母浓度的食物提供充足营养来维持果蝇的生长发育。在 0.25% 和 1.00% 酵母浓度的食物中, CR 卵发育成蛹所需要的时间分别为 6.8 ± 0.4 d 和 4.9 ± 0.2 d, 而 GF 卵发育成蛹分别需要 17.9 ± 0.3 d 和 11.8 ± 0.2 d。由此可见, 在 0.25% 和 1.00% 酵母浓度的食物中, GF 卵发育成蛹的时间和 CR 相比有明显差异, 分别延迟约 11 d ($P < 0.001$) 和 7 d ($P < 0.001$), 并且这种差异与食物酵母浓度呈负相关。同样地, 在 0.25% 和 1.00% 酵母浓度的食物中, 与 CR 相比, 表皮葡萄球菌共生果蝇成蛹时间分别延迟了 1.5 d ($P < 0.01$) 和 1 d ($P < 0.01$), 与 GF 相比却提前了 9 d ($P < 0.01$) 和 5 d ($P < 0.01$), 与乳植杆菌极为相似。这些数据显示果蝇共生菌能够缩短果蝇的发育历期, 促进果蝇的发育, 而且这种促发育效果在营养不良条件下更明显。表皮葡萄球菌的加入显著改善了 GF 在营养不良条件下的发育状况(图 3), 表明表皮葡萄球菌能够加速宿主的发育, 但并非是满足果蝇营养需求的唯一共生菌。由图 3B 可见表皮葡萄球菌在果蝇羽化方面起着同样重要的作用。

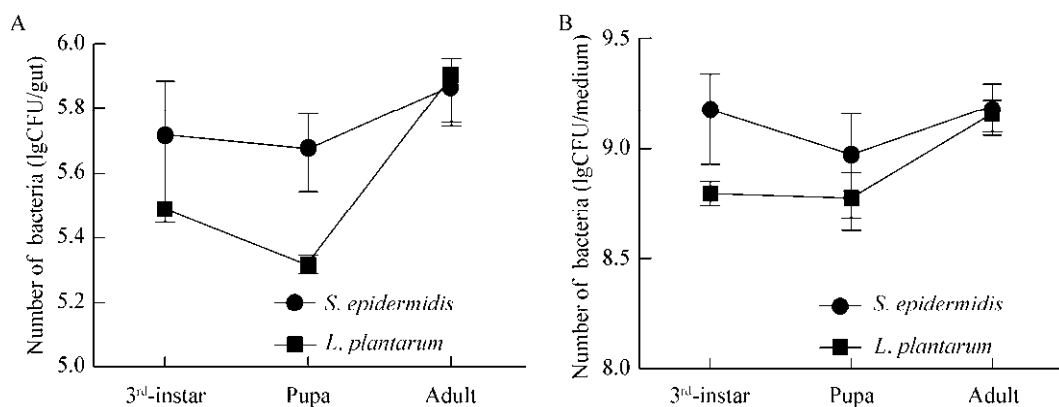


图 2 表皮葡萄球菌在果蝇肠道和培养基中定殖

Figure 2 Colonization of *S. epidermidis* in the gut of *D. melanogaster* and medium

注: A: 表皮葡萄球菌和乳植杆菌在果蝇肠道内定殖; B: 表皮葡萄球菌和乳植杆菌在培养基中增殖。3rd-instar: 3 龄幼虫; Adult: 新羽化的成虫。数据代表包含 6 个个体的 3 次重复试验的平均值 $\pm$ 标准误。

Note: A: Colonization of *S. epidermidis* and *L. plantarum* in the gut of *D. melanogaster*; B: Colonization of *S. epidermidis* and *L. plantarum* in the medium. 3rd-instar: 3rd instar stage larva; Adult: Newly emergence adult. Data represent the mean of 3 biological replicates containing 6 individuals each $\pm$ SEM.

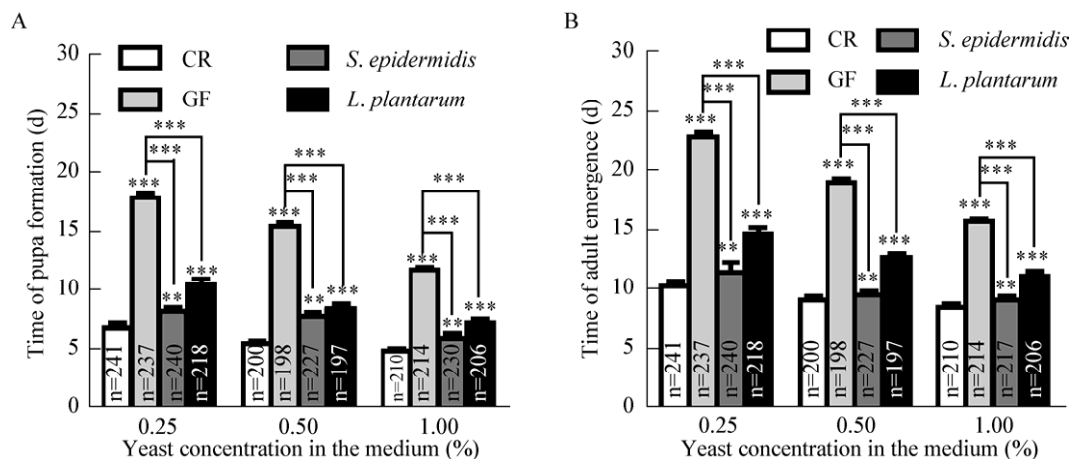


图3 表皮葡萄球菌促进果蝇蛹的形成和羽化

Figure 3 *S. epidermidis* promoted the timing of fly development

注: A: CR、GF、表皮葡萄球菌果蝇和乳植杆菌果蝇在不同浓度酵母食物中蛹形成的时间; B: CR、GF、表皮葡萄球菌果蝇和乳植杆菌果蝇在不同浓度酵母食物中成虫形成的时间. 数据代表包含 30 只个体的 5 次重复试验的平均值 $\pm$ 标准误, 经 *t* 检验检测差异的显著性. ***: $P < 0.001$; **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$. 柱状图上的星号表示与 CR 的比较, 实线上的星号表示设计组的比较.

Note: A: The timing of pupa formation of CR, GF, *S. epidermidis*-associated flies and *L. plantarum*-associated flies in food with different yeast concentrations; B: The timing of adult emergence of CR, GF, *S. epidermidis*-associated flies and *L. plantarum*-associated flies in fly food with different yeast concentrations. Data represent the mean of 5 biological replicates containing at least 30 individuals each $\pm$ SEM, and significant different was test by *t* test. ***: $P < 0.001$; **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$, the asterisks above bar charts denote the comparison with CR, while the ones above solid lines denote the comparison of designed group.

2.4 表皮葡萄球菌提高果蝇的生长速率

已有研究证明, GF 成虫的体重与 CR 相比没有明显差异^[17]. 然而, 表皮葡萄球菌能够显著缩短果蝇的发育历期(图 3), 提示表皮葡萄球菌可能是通过提高果蝇的生长速率以缩短生长历期. 为了量化果蝇生长速率, 测量并比较 CR、GF、表皮葡萄球菌和乳植杆菌共生 1 龄至蛹期的幼虫体表面积. 如图 4A 所示, 根据线性回归分析, 在营养条件丰富(4% 酵母浓度)的情况下, CR、GF、表皮葡萄球菌共生果蝇和乳植杆菌共生果蝇的生长速率分别为 7.626×10^5 、 6.507×10^5 、 7.296×10^5 和 $7.226 \times 10^5 \mu\text{m}^2/\text{d}$, 无明显差异. 然而在营养不良的情况下(图 4B), CR、GF、表皮葡萄球菌共生果蝇和乳植杆菌共生果蝇的生长速率分别为 7.011×10^5 、 3.552×10^5 、 5.936×10^5 和 $5.296 \times 10^5 \mu\text{m}^2/\text{d}$, CR 和表皮葡萄球菌共生果蝇与 GF 相比分别快 2.0 倍和 1.7 倍, 乳植杆菌共生果蝇生长速率也是 GF 的 1.5 倍, 表明表皮葡萄球菌能够提高营养不良条件下果蝇的生长速率. 结合上述生长发育的结果可以证明, 表皮葡萄球菌通过提

高生长速率加速了果蝇的生长发育.

2.5 表皮葡萄球菌影响果蝇脑促前胸腺激素的表达

蜕皮激素是果蝇体内的一种甾体类激素, 它能够加速果蝇从 3 龄幼虫到蛹期的转化^[18]. 已有研究表明, 大脑分泌的促胸腺激素(Prothoracicotropic hormone, PTTH)在蜕皮激素的产生和释放过程中发挥着重要作用^[19]. 在果蝇体内, PTTH 的表达受果蝇发育时间的影响, 其含量在 3 龄幼虫期和蛹的早期达到峰值, PTTH 因而成为评价果蝇发育状况的分子指标. 如图 5A 所示, CR 中 PTTH 含量在 7 d 时达到峰值, 而在 GF 中 10 d 时才达到峰值, 且 CR 中的表达量明显高于 GF, 这表明肠道菌群的联合作用激发了果蝇体内激素的分泌, 该结果与前文所述的 CR 果蝇发育比 GF 快的情况相符. 另一方面, 在表皮葡萄球菌共生果蝇体内, PTTH 含量在 8 d 时达高峰, 并且它的表达量比 GF 高但比 CR 低, 表明共生表皮葡萄球菌能够显著改善 GF 果蝇发育延迟的状况, 加快幼虫向蛹期的过渡.

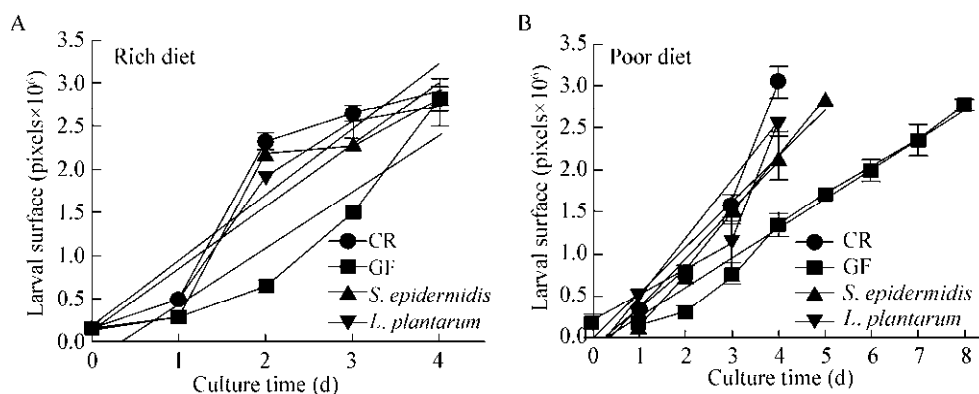


图4 表皮葡萄球菌提高果蝇的生长速率

Figure 4 *S. epidermidis* association promoted larval growth rate

注: A: 丰富营养(2%酵母浓度)条件下, CR、GF、表皮葡萄球菌果蝇和乳植杆菌果蝇的体表面积回归曲线; B: 贫瘠营养(0.5%酵母浓度)条件下, CR、GF、表皮葡萄球菌果蝇和乳植杆菌果蝇的体表面积回归曲线。数据代表包含10个个体的3次重复试验的平均值 $\pm$ 标准误。

Note: A: Larval surface area of CR, GF, *S. epidermidis*-associated larvae and *L. plantarum*-associated larvae over time when grown on rich diet (2% yeast). Linear regression curves are included (CR, $y=0.762\ 6x-0.237\ 2$; GF, $y=0.650\ 7x-0.335\ 8$; *S. epidermidis*, $y=0.729\ 6x-0.124\ 4$; *L. plantarum*, $y=0.722\ 6x-0.159\ 2$); B: Larval surface area of CR, GF, *S. epidermidis*-associated larvae and *L. plantarum*-associated larvae over time when grown on poor diet (0.5% yeast). Linear regression curves are included (CR, $y=0.701\ 1x-0.218\ 6$; GF, $y=0.355\ 2x-0.134\ 4$; *S. epidermidis*, $y=0.593\ 6x-0.236\ 4$; *L. plantarum*, $y=0.529\ 6x-0.0295\ 4$). Data represent the mean of 3 biological replicates containing at least 10 individuals each $\pm$ SEM.

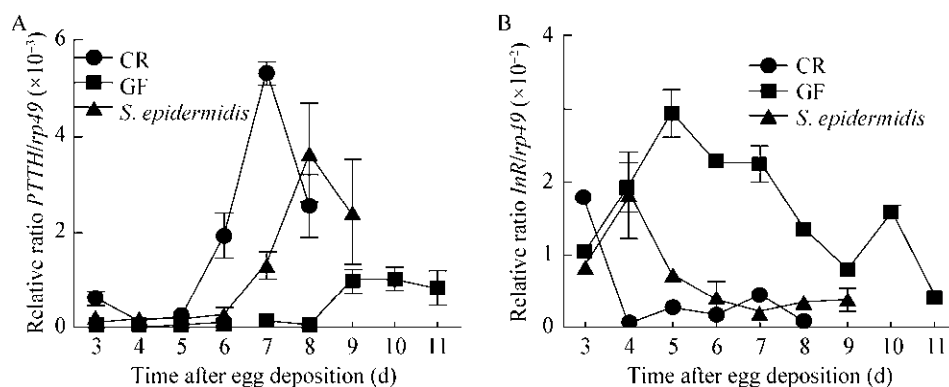


图5 表皮葡萄球菌促进果蝇激素分泌和调节果蝇胰岛素信号通路

Figure 5 *S. epidermidis* promoted the expression of hormonal and regulation of insulin signals

注: A: CR、GF和表皮葡萄球菌果蝇的脑促前胸腺激素 mRNA 的转录水平, 实时定量 PCR 检测 *PTTH* 相对于 *rp49* 的表达量; B: CR、GF和表皮葡萄球菌果蝇的脑促前胸腺激素 mRNA 的转录水平, 实时定量 PCR 检测 *InR* 相对于 *rp49* 的表达量。图中的数据代表平均值 $\pm$ 标准误。

Note: A: The *PTTH* mRNA level of CR, GF and *S. epidermidis*-associated *D. melanogaster*. *PTTH* expression relative to *rp49* was analyzed by quantitative RT-PCR; B: The *InR* mRNA level of CR, GF and *S. epidermidis*-associated *D. melanogaster*. *InR* expression relative to *rp49* was analyzed by quantitative RT-PCR. Data in figures are mean $\pm$ SEM.

2.6 表皮葡萄球菌激活胰岛素信号通路

已有研究表明, 共生菌能够通过激活胰岛素信号通路来加速果蝇的发育^[20]。为了检验表皮葡萄球菌对胰岛素通路的作用, 借助实时定量 PCR 检测了 *InR* 的表达量。*InR* 是胰岛素信号通路的负调控相关基因, 也就是说较低的 *InR* 表达量意味着胰岛素信号通路的高活性。如图 5B 所示, 在 CR 果蝇的幼虫期和蛹的早期 *InR* 的表达水平较低, 反映了 CR 果蝇体内胰岛素通路活跃。相反地, GF 果蝇幼虫早期体内的 *InR* 表达量较高, 在 3 龄幼虫后期有所下降, 表明在 GF 果蝇体内胰岛素信号通路的激活存在延迟现象, 这与前文所述的 GF 发育较 CR 缓慢的现象相符, 说明共生菌能够在宿主发育早期激活其胰岛素信号通路。类似地, *InR* 在表皮葡萄球菌共生果蝇体内的表达量比 GF 果蝇低, 但比 CR 果蝇略高, 表明表皮葡萄球菌能够提高胰岛素信号通路的活性来提高果蝇的生长速率。

3 讨论与结论

包括人类在内的所有后生动物都与共生微生物有着错综复杂的联系, 这些微生物影响着宿主的健康和疾病。表皮葡萄球菌是滋生于生物体表皮上的一种细菌, 可在人体的皮肤、阴道等部位寄生, 属正常菌群类型。共生菌通常会形成特定的机制来逃避宿主的免疫反应, 从而使宿主的肠道细菌得以稳定^[21]。本次实验从果蝇肠道内分离得到了一株表皮葡萄球菌(图 1)。本实验数据显示, 表皮葡萄球菌能够有效地定殖在果蝇肠道, 表明表皮葡萄球菌是果蝇的肠道共生菌(图 2)。肠道细菌群落的组成和数量随食物、环境和宿主生理活动的变化而呈现动态波动^[22]。果蝇属于腐生生物, 主要以腐烂的水果为食。在此过程中, 多种细菌和植物性食物的混合物进入果蝇肠道补充了肠道菌群的丰富度。此外, 表皮葡萄球菌进入果蝇肠道后, 在果蝇发育早期, 载菌量从无到有, 呈现快速增加, 但三龄幼虫及其以后, 载菌量趋

于稳定, 达到动态平衡。反过来, 果蝇作为微生物的载体, 有效地促进了微生物在环境中的扩散。因此, 表皮葡萄球菌与果蝇形成了一种互利的关系。

在本实验中, 表皮葡萄球菌显示出了相似的作用(图 3 和 4), 能够通过提高果蝇的生长速率来缩短果蝇的发育历期, 这进一步支持了“表皮葡萄球菌是果蝇共生菌”的观点。已有研究表明, 乳植杆菌能够在营养不良的条件下通过促进幼虫生长速率和缩短生长期的持续时间来促进宿主的整体发育^[17]。本实验与之前其他实验均显示微生物对于果蝇的生长发育是必需的^[23]。肠道共生细菌能够刺激宿主消化道内消化酶的分泌, 帮助宿主消化复杂的食物, 合成营养物质^[24]。因此, 对于果蝇而言, 饮食中含有细菌更有利于果蝇的生长发育。在本次实验中, 表皮葡萄球菌能够明显改显 GF 果蝇生长缓慢的状态(图 3 和 4)。然而, 相对于 CR 果蝇而言, 表皮葡萄球菌共生果蝇的发育历期依旧有延迟, 表明表皮葡萄球菌虽然是果蝇的共生菌, 但其作为单株细菌在刺激果蝇生长发育方面的作用并不能完全替代共生菌群, 这也就意味着表皮葡萄球菌必须与其他共生菌合作来促进果蝇生长发育。试验中高浓度的酵母浸出物能够改善 CF 果蝇的发育状况, 说明微生物能够通过蛋白质富集和维生素合成等营养功能加速宿主的发育。

蜕皮激素是果蝇体内可以刺激羽化的一种激素, 而脑促胸腺激素则可以调控蜕皮激素的产生和释放。胰岛素信号通路在葡萄糖摄取、动态调控蛋白质转录和翻译、促进细胞分裂增殖、调控机体生长发育和代谢全过程都发挥着重要作用。本实验数据显示, 在分子水平上, 表皮葡萄球菌一方面可以在果蝇变态期激发体内脑促胸腺激素的表达, 另一方面可以激活胰岛素信号通路(图 5)。表皮葡萄球菌能够在果蝇发育前期降低 *InR* 基因的表达量, 表明该细菌能够在早期激发

果蝇体内的胰岛素信号通路, 从而促进果蝇的生长发育。另外, 微生物可以促进宿主体内肠肽酶的表达, 进而促进蛋白质消化^[25], 表皮葡萄球菌对果蝇生长发育的作用机制有待于进一步探索。

综上所述, 表皮葡萄球菌作为果蝇的共生菌能够促进宿主的生长, 果蝇则提供了一个极好的模型来破译微生物和宿主之间错综复杂的关系, 从而有利于更好地了解微生物和宿主世界之间的生态关系。

REFERENCES

- [1] Staubach F, Baines JF, Künzel S, et al. Host species and environmental effects on bacterial communities associated with *Drosophila* in the laboratory and in the natural environment[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e70749
- [2] Shin SC, Kim SH, You H, et al. *Drosophila* microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling[J]. Science, 2011, 334(6056): 670-674
- [3] Ren CL, Webster P, Finkel SE, et al. Increased internal and external bacterial load during *Drosophila* aging without life-span trade-off[J]. Cell Metabolism, 2007, 6(2): 144-152
- [4] Venema K. Role of gut microbiota in the control of energy and carbohydrate metabolism[J]. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, 2010, 13(4): 432-438
- [5] Bäckhed F, Fraser CM, Ringel Y, et al. Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications[J]. Cell Host & Microbe, 2012, 12(5): 611-622
- [6] Gabrieli P, Smidler A, Catteruccia F. Engineering the control of mosquito-borne infectious diseases[J]. Genome Biology, 2014, 15(11): 535
- [7] Kloos WE, Musselwhite MS. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin[J]. Applied Microbiology, 1975, 30(3): 381-385
- [8] Iwase T, Uehara Y, Shinji H, et al. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization[J]. Nature, 2010, 465(7296): 346-349
- [9] Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics[J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11(2): 95-105
- [10] Heng NCK, Wescombe PA, Burton JP, et al. The diversity of bacteriocins in gram-positive bacteria[A]//Riley MA, Chavan MA. Bacteriocins: Ecology and Evolution[M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2007: 45-92
- [11] Rogers KL, Fey PD, Rupp ME. Coagulase-negative staphylococcal infections[J]. Infectious Disease Clinics of North America, 2009, 23(1): 73-98
- [12] Chu VH, Miro JM, Hoen B, et al. Coagulase-negative staphylococcal prosthetic valve endocarditis — a contemporary update based on the international collaboration on endocarditis: prospective cohort study[J]. Heart, 2009, 95(7): 570-576
- [13] Su LT, Liang JL, Guo XJ, et al. Comparison of methods for DNA extraction in *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Zhongkai University of Agriculture and Engineering, 2011, 24(1): 15-19 (in Chinese)
- [14] Yao W, Zhu WY, Mao SY. Tracking of the development of fecal bacterial community of diarrhea piglets by 16S rDNA techniques[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2006, 46(1): 150-153 (in Chinese)
- [15] Zhou W, Zhang WQ, Fu Y, et al. SYBR Green I fluorescence quantitative PCR detection of *Escherichia coli* in raw milk[J]. China Dairy Industry, 2009, 37(11): 39-42 (in Chinese)
- [16] Storelli G, Defaye A, Erkosar B, et al. *Lactobacillus plantarum* promotes *Drosophila* systemic growth by modulating hormonal signals through TOR-dependent nutrient sensing[J]. Cell Metabolism, 2011, 14(3): 403-414
- [17] Li YJ, Su WZ, Hu KK, et al. *Lactobacillus plantarum* promotes the growth and development of *Drosophila melanogaster*[J]. Acta Entomologica Sinica, 2017, 60(5): 544-552 (in Chinese)
- [18] Garelli A, Gontijo A M, Miguela V, et al. Imaginal discs secrete insulin-like peptide 8 to mediate plasticity of growth and maturation[J]. Science, 2012, 336(6081): 579-582
- [19] Rybczynski R. 3.2-Prothoracicotropic hormone[J]. Comprehensive Molecular Insect Science, 2005, 3: 61-123
- [20] Richard DS, Rybczynski R, Wilson TG, et al. Insulin signaling is necessary for vitellogenesis in *Drosophila melanogaster* independent of the roles of juvenile hormone and ecdysteroids: female sterility of the *chico*¹ insulin signaling mutation is autonomous to the ovary[J]. Journal of Insect Physiology, 2005, 51(4): 455-464
- [21] Sharon G, Segal D, Ringo JM, et al. Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(46): 20051-20056
- [22] Blum JE, Fischer CN, Miles J, et al. Frequent replenishment sustains the beneficial microbiome of *Drosophila melanogaster*[J]. mBio, 2013, 4(6): e00860
- [23] Cao Y, Wang YY, Zheng XF, et al. RevEcoR: an R package for the reverse ecology analysis of microbiomes[J]. BMC Bioinformatics, 2016, 17: 294
- [24] Chaston JM, Dobson AJ, Newell PD, et al. Host genetic control of the microbiota mediates the *Drosophila* nutritional phenotype[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 82(2): 671-679
- [25] Erkosar B, Storelli G, Mitchell M, et al. Pathogen virulence impedes mutualist-mediated enhancement of host juvenile growth via inhibition of protein digestion[J]. Cell Host & Microbe, 2015, 18(4): 445-455