

# 中国林蛙蝌蚪肠道及皮肤微生物多样性分析

申喻嘉 任超璐 滕依然 陈晓燕 李忻怡\*

陕西师范大学生命科学院 西安 710000

**摘要:** 肠道及皮肤微生物群落对宿主的健康有着至关重要的影响。本研究使用 16S rRNA 基因测序技术研究中国林蛙 (*Rana chensinensis*) Gosner38 期蝌蚪肠道和皮肤共生微生物群落组成之间的差异。在门水平上, 林蛙蝌蚪肠道中的优势门为变形菌门 (Proteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes), 皮肤中的优势门为拟杆菌门、变形菌门和疣微菌门 (Verrucomicrobia)。此外, 显著性检验结果显示, 肠道中厚壁菌门和放线菌门 (Actinobacteria) 的丰度显著偏高, 皮肤中拟杆菌门的丰度显著偏高。肠道微生物群落多样性高于皮肤, 而肠道和皮肤的物种丰富度之间无显著差异。在对 KEGG 通路的丰度进行比较时, 结果显示肠道“环境信息处理”功能的丰度显著高于皮肤, 而皮肤中“遗传信息处理”及“新陈代谢”功能显著偏高。本研究提示林蛙蝌蚪肠道及皮肤微生物群落组成之间存在显著差异。

**关键词:** 16S rRNA 测序; 两栖动物; 肠道微生物; 皮肤微生物; 中国林蛙蝌蚪

**中图分类号:** Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2021) 03-417-15

## Analysis of Skin and Gut Microbiota in the *Rana chensinensis* Tadpoles

SHEN Yu-Jia REN Chao-Lu TENG Yi-Ran CHEN Xiao-Yan LI Xin-Yi\*

Shaanxi Normal University, College of Life Sciences, Xi'an 710000, China

**Abstract:** The gut and skin play important roles in the body's immune system and are often exposed to the external environment. The difference in microbial communities can reflect the changes of the host in response to different environmental conditions. While numerous gut and skin microbia have been characterized, there is no comparative analysis of the gut and skin microbial communities in the amphibian. In our study, we examined the difference of gut and skin tissues of *Rana chensinensis* tadpoles by hematoxylin-eosin (H.E) and Masson staining. Furthermore, we investigated the difference of gut and skin microbial communities in *R. chensinensis* tadpoles at Gosner stage 38 by using high-throughput 16S rRNA sequencing technology. The statistical significance of difference was determined by the Student's *T*-test. Our results revealed that: (1) There were histological structure difference of gut and ventral skin in tadpoles (Fig. 1). (2) The alpha diversity analysis showed that the microbial community biodiversity in the gut was significantly higher than that in the skin ( $P \leq 0.001$ ), while there was no difference in community richness between gut and skin

**基金项目** 陕西省自然科学基金项目 (No. 2019JM-391);

\* 通讯作者, E-mail: lixinyi@snnu.edu.cn;

**第一作者介绍** 申喻嘉, 女, 硕士研究生; 研究方向: 发育生物学; E-mail: 429049416@qq.com。

收稿日期: 2020-10-09, 修回日期: 2021-02-05 DOI: 10.13859/j.cjz.202103012

samples ( $P > 0.05$ ; Fig. 3). In addition, the hierarchical cluster and PCoA analysis showed that the distance of microbial communities between these two tissues was clearly separated from one another (Fig. 4). (3) Venn diagram showed that 175 OTUs were shared by the gut and skin, while 70 OTUs were independently presented in the gut, and 87 in the skin (Fig. 5). (4) A taxonomic analysis revealed that the most prevalent phyla in the gut were Bacteroidetes, Proteobacteria and Verrucomicrobia, whereas the predominant phyla found in skin were Proteobacteria, Firmicutes and Bacteroidetes (Fig. 6a). Moreover, the Student's *T*-test results revealed that the abundance of Firmicutes and Actinobacteria in the gut was significantly higher than in the skin, while the abundance of Bacteroidetes was just significantly higher in the skin ( $P \leq 0.05$ ; Fig. 6b). (5) The functional prediction results indicated that the abundance of "environmental information processing" function was significantly higher in the gut, whereas the "genetic information processing" and "metabolism" functions were significantly higher in the skin ( $P \leq 0.01$ ; Fig. 9). The results of this study revealed that there were significant differences in the composition of microbial communities in the gut and skin of *R. chensinensis* tadpoles. These differences will promote the growth and development of tadpoles to adapt to environmental changes.

**Key words:** 16S rRNA sequencing; Amphibian; Gut microbiome; Skin microbiome; *Rana chensinensis* tadpoles

肠道是机体最重要的消化器官，也是数万亿共生微生物的主要栖息场所。肠道微生物群落由细菌、真菌、病毒和古细菌所组成 (Barko et al. 2018)。肠道微生物群落作为宿主生理活动的积极参与者，可以调节宿主的代谢和生理功能，从而有助于其内稳态的平衡 (Tojo et al. 2014)。同样，肠道微生物对于机体健康的维持等方面也发挥着至关重要的作用 (Mowat et al. 2014, Barko et al. 2018)。例如，目前已知肠道微生物菌群的变化对于宿主的脂代谢调节 (Ghazalpour et al. 2016, Rangan et al. 2017)、能量平衡 (Semova et al. 2012)、免疫功能 (Round et al. 2009)、发育 (Palm et al. 2015, Tuddenham et al. 2015)、行为 (Heijtz et al. 2011) 等过程均存在一定程度的影响。

皮肤作为机体最大的器官 (Gallo 2017)，直接接触外界环境，可以为机体提供物理屏障，从而抵御各种来自外界物质的侵袭 (Sanford et al. 2013)。同样，皮肤上存在着极高多样性的微生物群落，这些微生物群落可以与皮肤细胞相互作用，对皮肤的机能产生一定程度的影响。反之，皮肤结构功能的改变也会影响微生物群

落的组成。宿主细胞与微生物之间的相互作用维系宿主体内的平衡和健康，一旦失衡则会导致宿主产生疾病 (Sanford et al. 2013, Schommer et al. 2013, Belkaid et al. 2014)。

目前已有较多关于两栖动物肠道或皮肤微生物的研究，如虎纹蛙 (*Rana rugulosa*) (刘文舒等 2020a) 黑斑蛙 (*R. nigromaculata*) (刘文舒等 2020b) 和美国树蟾 (*Hyla cinerea*) (Albecker et al. 2019) 等。而本实验室主要着眼于药物处理对两栖动物肠道微生物群落的影响 (Wang et al. 2019, Yao et al. 2019, Liu et al. 2020, Zheng et al. 2020)。然而，至目前为止，对中国林蛙 (*R. chensinensis*) 肠道以及皮肤微生物群落的比较分析仍知之甚少。皮肤和肠道作为机体免疫系统中的重要器官，经常会暴露在外界环境中，微生物群落的差异可以反映宿主在外界环境毒素胁迫下所产生的变化 (Coates et al. 2019, Fu et al. 2020)。已有报道表明，两栖动物的皮肤及肠道微生物在不同生境中存在一定的特异性 (Kueneman et al. 2014, Bletz et al. 2016)。其中两栖动物皮肤微生物群落的调节机制较为独特，受到多种因素的影响，

如环境、皮肤的脱落以及一些特殊的皮肤分泌物等 (McKenzie et al. 2012, Colombo et al. 2015)。因此, 本研究使用 16S rRNA 扩增子测序技术对 Gosner38 期 (Gosner et al. 1960) 中国林蛙的肠道及皮肤微生物群落进行了分析比较, 从而对蝌蚪内、外部微生物群落组成及结构的差异进行了阐述。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物的采集与饲养

2020 年 2 月从陕西省秦岭山脉 (109°06'52" E, 34°00'56" N) 采集性成熟雌性林蛙所产卵团, 置于玻璃培养箱中。适应 1 周后, 将幼体随机分到 5 个含有 4 L 脱氯自来水的玻璃培养箱中, 每培养箱 10 只, 共 50 只。保持 (20 ± 2) °C 室温、12 h 光照: 12 h 黑暗光周期。每隔 3 d 换水、饲喂煮熟的油麦菜 (*Lactuca sativa*)。

### 1.2 组织学研究

随机从每个培养箱中捞取 1 只 Gosner38 期林蛙蝌蚪, 使用 Bouin's 固定液固定。48 h 后, 对整只蝌蚪进行升序乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片 (厚度 5 μm)。使用苏木精-伊红 (H.E) 和三色 (Masson) 法对组织切片进行染色, 并置于正置荧光显微镜 (Axio Imger M, 德国蔡司) 下观察、拍照。

### 1.3 DNA 提取及 PCR 扩增

从每个培养箱中随机采集 4 只 Gosner38 期蝌蚪, 共 20 只。在无菌条件下, 分别将蝌蚪肠道 (食道后部至肛管) 及皮肤取出, 置于 2 ml 微量存液管中, 储存在 -80 °C 以备后续使用。使用 E. Z.N.A.® Soil DNA Kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, U.S.) 试剂盒在无菌条件下提取肠道、皮肤样本中的微生物基因组 DNA。使用 NanoDrop 2000 紫外分光光度计 (NanoDrop, Wilmington, DE, USA) 和 1% 琼脂糖凝胶电泳评估 DNA 样本的浓度、纯度和质量。

使用通用引物 338F (5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC A-3') 和 806R (5'-GGA CTA

CHV GGG TWT CTA AT-3') (H: A/C/T; V: A/C/G; W: A/T) 扩增出细菌 16S rRNA 基因的 V3 和 V4 区。PCR 反应各参数均参照 Mu 等 (2018) 的方法进行。

### 1.4 Illumina MiSeq 测序分析

扩增产物使用 2% 琼脂糖凝胶电泳评估、Agencourt AMPure Beads (Beckman Coulter, Indianapolis, IN) 纯化和 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 定量检测。随后使用 Illumina MiSeq 平台 (Illumina, San Diego, CA) 双端测序。

分别使用 QIIME (<http://qiime.org/install/index.html>)、Usearch (<http://drive5.com/uparse/>) 软件对原始 16S rRNA 基因数据进行筛选、聚类 (相似性 ≥ 97%)。根据 Silva 数据库 (Release132, <http://www.arb-silva.de>) 使用 RDP classifier (<http://sourceforge.net/projects/rdp-classifier/>) 算法对每个操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU) 进行注释。置信度阈值为 70%。

### 1.5 生物信息学与统计学分析

使用 Mothur ([http://www.mothur.org/wiki/Schloss\\_SOP#Alpha\\_diversity](http://www.mothur.org/wiki/Schloss_SOP#Alpha_diversity)) 软件计算 Alpha 多样性指数, 通过 Student's *T*-检验分析其统计学差异。使用 R 语言工具绘制稀释性曲线图和韦恩图。此外, 利用 QIIME 软件和 R 语言工具分析样本的 Beta 多样性: 基于 unweighted-unifrac 距离算法使用非加权组平均法 (unweighted pair-group method with arithmetic mean, UPGMA) 对 OTU 进行层级聚类分析、基于 euclidean 距离算法对门水平进行主坐标分析 (principal co-ordinates analysis, PCoA)。使用 R 语言工具绘制不同分类水平肠道和皮肤微生物的群落组成和丰度图。并使用 R 语言工具的 stats 包和 python 语言工具的 scipy 包对物种组成差异进行了 Student's *T*-检验分析。此外, 通过 Tax4Fun 软件对 16S rRNA 基因序列进行了 KEGG 功能预测, 并对肠道和皮肤各级功能水平的丰度值进行了 Student's *T*-检验分析。

## 2 结果

### 2.1 组织学分析

Gosner38 期林蛙蝌蚪肠道肠黏膜由单层柱状上皮细胞组成，黏膜上皮细胞分布均匀，细胞边界清晰，细胞核排列规则（图 1a, b）；皮肤组织中表皮清晰可见，由 1 或 2 层圆形或椭圆形的扁平细胞组成，细胞界限明显，细胞核扁圆形，无颗粒腺和微血管分布（图 1c, d）。

### 2.2 测序分析

MiSeq 测序技术分析，筛选后共获得 420 438 个有效序列，序列长度为 363 ~ 458 bp，平均长度为 419 bp。按照 97% 的序列相似性可聚类为 332 个 OTU。稀释曲线见图 2，曲线趋于平坦，表明测序数据量足够大，可以反映样

本中绝大多数的微生物多样性信息。

### 2.3 $\alpha$ 多样性指数

林蛙肠道、皮肤微生物的  $\alpha$  多样性指数见图 3。其中香农 (Shannon)、辛普森 (Simpson) 指数反映微生物群落的多样性，而 ace、chao1 指数反映微生物群落的丰富度。肠道香农指数显著高于皮肤，皮肤辛普森指数显著高于肠道（图 3，Student's *T*-检验， $P \leq 0.001$ ），表明肠道微生物群落多样性高于皮肤。此外，皮肤 ace、chao1 指数略高于肠道，但无显著差异 (Student's *T*-检验， $P > 0.05$ )，表明其间物种丰富度大体相同。

### 2.4 $\beta$ 多样性指数

主坐标分析和样本层级聚类分析反映肠道

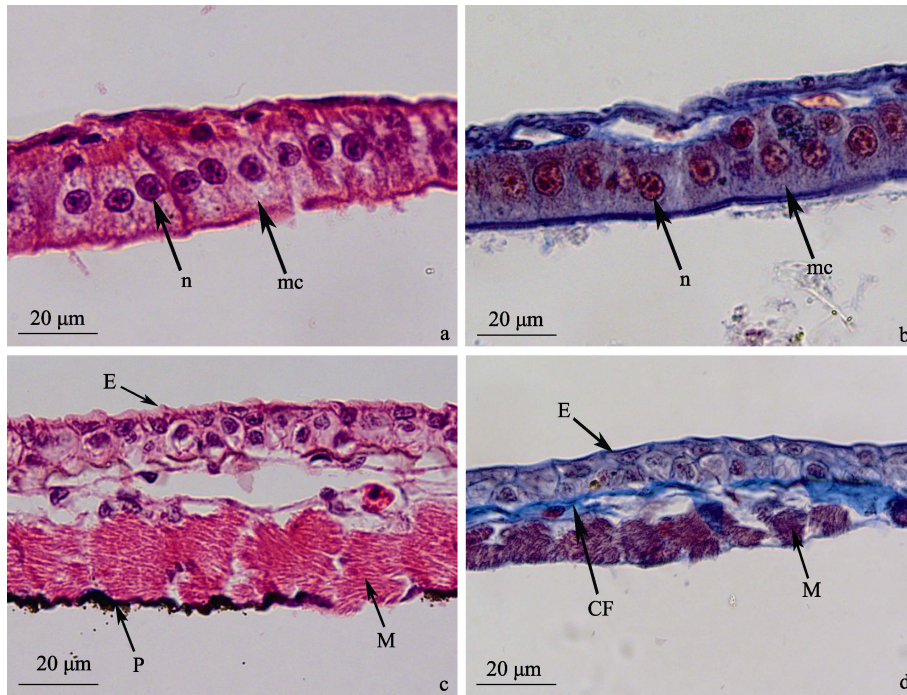


图 1 Gosner38 期林蛙肠道及皮肤的组织切片 (40 ×)

Fig. 1 Histological characteristics of *Rana chensinensis* gut and skin at Gosner38 stage (40 ×)

a. 肠道 (H.E 染色); b. 肠道 (Masson 染色); c. 皮肤 (H.E 染色); d. 皮肤 (Masson 染色)。

a. Gut (H.E staining); b. Gut (Masson staining); c. Skin (H.E staining); d. Skin (Masson staining).

CF. 胶原纤维; E. 表皮; M. 肌肉; mc. 黏膜上皮细胞; n. 细胞核; P. 色素

CF. Collagenous Fiber; E. Epidermis; M. Muscle; mc. Mucosal epithelial cells; n. Cell nucleus; P. Pigment

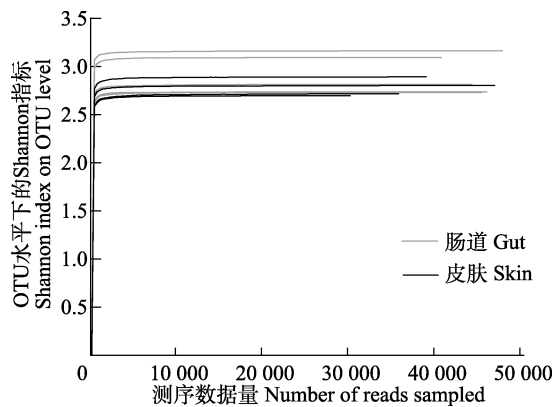


图2 Gosner38期林蛙肠道和皮肤微生物的稀释曲线  
Fig. 2 The rarefaction curve of *Rana chensinensis* gut and skin microbial samples at Gosner38 stage

和皮肤样本间群落组成的差异和距离。根据 unweighted-unifrac 距离算法在 OTU 水平上进行层级聚类分析，肠道和皮肤的样本各自聚为一类（图 4a）。此外，基于 euclidean 距离算法在门水平上进行主坐标分析，样本明显归为两个组（PC1 77.34% vs. PC2 12.44%），表明林蛙肠道和皮肤微生物的组成存在差异（图 4b）。

## 2.5 OTU 分布

按照 97% 的相似性，可将序列分为 332 个 OTU。韦恩图结果显示，肠道和皮肤样本之间有 175 个（52.71%）相同的 OTU，肠道中有 70 个（21.08%）独有的 OTU，皮肤中有 87 个（26.21%）独有的 OTU（图 5）。皮肤中的 OTU 数量略高于肠道，这与 chao1 指数的结果一致。

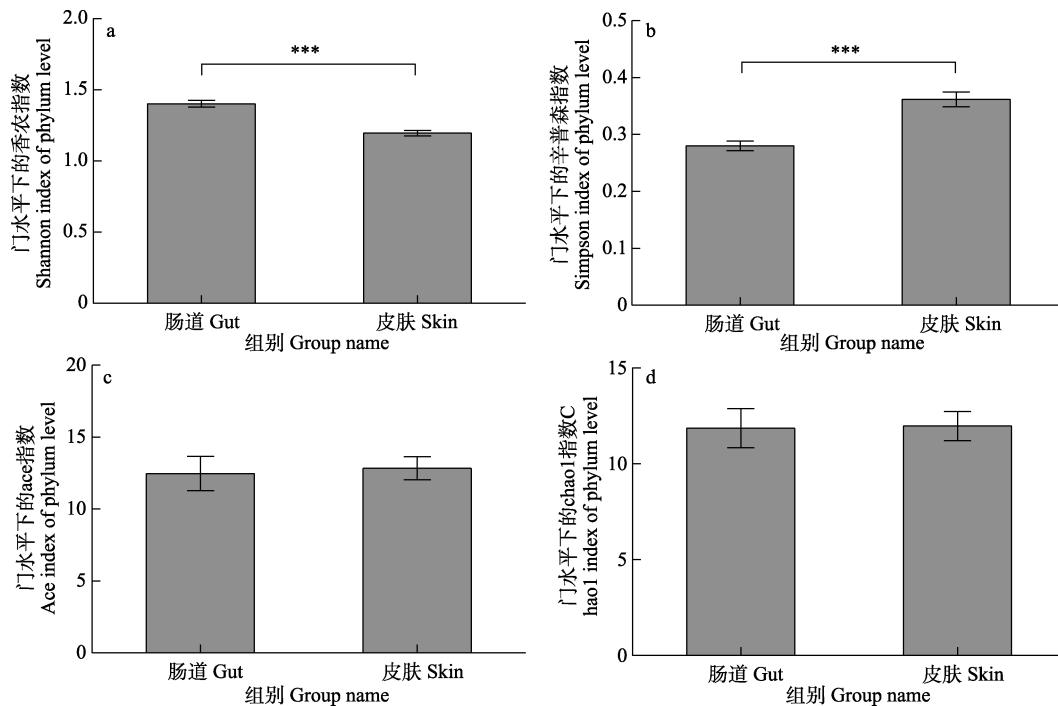


图3 Gosner38期林蛙门水平下肠道和皮肤微生物的  $\alpha$  多样性指标

Fig. 3 The alpha diversity analysis of gut and skin microbiota in the *Rana chensinensis* at Gosner38 stage

菌群多样性指标：a. 香农指数，b. 辛普森指数；菌群丰富度指标：c. ace 指数，d. chao1 指数。Student's *T*-检验，\*\*\*  $P \leq 0.001$ 。

The bacterial diversity index: a. Shannon index, b. Simpson index. The bacterial richness index: c. ace index, d. chao1 index. Student's *T*-test, \*\*\*  $P \leq 0.001$ .

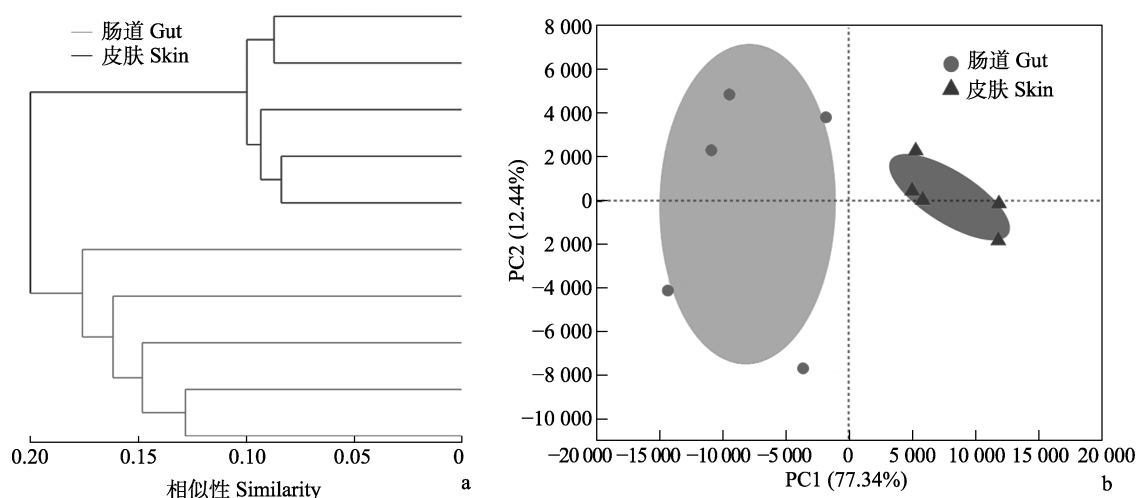


图 4 Gosner38 期林蛙肠道和皮肤微生物的  $\beta$  多样性

Fig. 4 The beta diversity analysis of gut and skin microbiota in the *Rana chensinensis* at Gosner38 stage

a. 使用 unweighted-unifrac 距离算法进行 OTU 水平上的层级聚类分析, b. 使用 euclidean 距离算法进行门水平上的主坐标分析。  
 a. Hierarchical cluster analysis using the unweighted-unifrac algorithm at OTU levels. b. Principal co-ordinates analysis using the euclidean algorithm at phylum level.

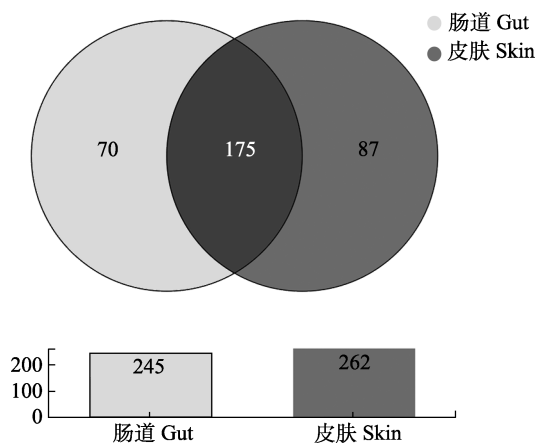


图 5 Gosner38 期林蛙 OTU 水平下肠道和皮肤微生物的韦恩图

Fig. 5 Venn diagrams of gut and skin microbiota in the *Rana chensinensis* at Gosner38 stage

### 2.6 不同分类水平下的微生物群落组成

通过 RDP classifier 贝叶斯算法对 97%相似水平的 OTU 进行分类学分析, 共检出 18 个门 32 个纲 72 个目 119 个科 210 个属 274 个种和 332 个 OTU。为了更直观地了解林蛙蝌

蚪肠道和皮肤微生物群落组成的差异, 分别对门、科、属水平上的微生物群落组成进行了分析 (图 6~8)。

在门水平上, 肠道和皮肤微生物的优势门共 5 个, 拟杆菌门 (Bacteroidetes)、变形菌门 (Proteobacteria)、疣微菌门 (Verrucomicrobia)、厚壁菌门 (Firmicutes) 和放线菌门 (Actinobacteria) (图 6a)。其中肠道中变形菌门所占比例最高 ( $33.95\% \pm 9.53\%$ ), 皮肤中拟杆菌门占比最大 ( $51.16\% \pm 5.31\%$ )。Student's *T*-检验, 皮肤中拟杆菌门的丰度显著高于肠道 ( $P \leq 0.001$ ), 肠道中厚壁菌门 ( $P \leq 0.01$ ) 和放线菌门 ( $P \leq 0.05$ ) 的丰度均显著高于皮肤, 而变形菌门和疣微菌门在肠道及皮肤中无显著差异 ( $P > 0.05$ ) (图 6b)。

在科水平上, 对林蛙蝌蚪肠道和皮肤微生物的相对丰度进行了比较 (图 7a)。肠道中丰度排名前五的菌科分别为, 拟杆菌科 (Bacteroidaceae,  $18.79\% \pm 7.05\%$ )、肠杆菌科 (Enterobacteriaceae,  $18.59\% \pm 8.53\%$ )、艾克曼菌科 (Akkermansiaceae,  $16.8\% \pm 3.83\%$ )、

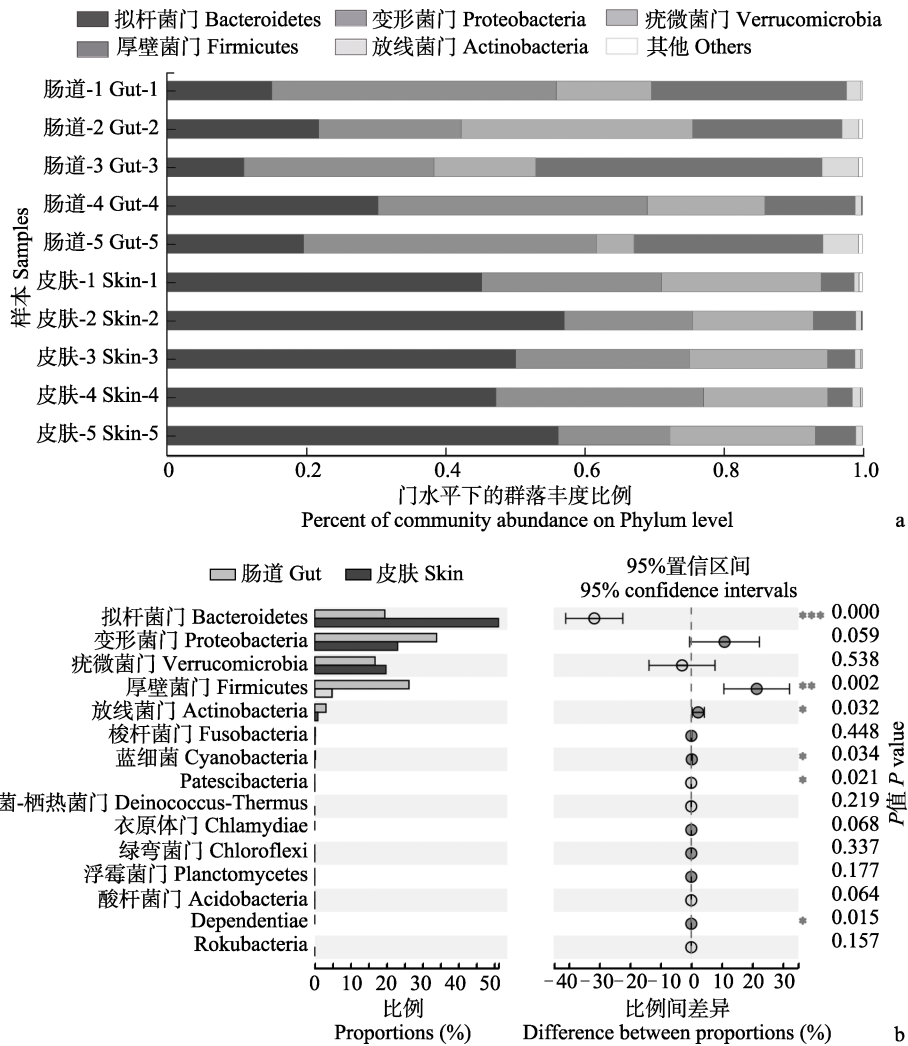


图 6 Gosner38 期林蛙门水平下肠道和皮肤微生物相对丰度的比较

Fig. 6 Comparison of relative abundance of gut and skin microbiota in the *Rana chensinensis* at a phylum level

a. 群落相对丰度条形图, b. 肠道、皮肤微生物间群落组成差异。Student’s *T*-检验, 星号表明存在统计学差异, \*  $0.01 < P \leq 0.05$ , \*\*  $0.001 < P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ 。

a. Community bar plot analysis of relative abundances. b. The differences in bacterial community composition between the gut and skin microbiota. Student’s *T*-test, significant differences are marked with an asterisk, \*  $0.01 < P \leq 0.05$ , \*\*  $0.001 < P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ .

毛螺菌科 (Lachnospiraceae,  $12.72\% \pm 5.48\%$ )、瘤胃球菌科 (Ruminococcaceae,  $8.33\% \pm 3.38\%$ )。皮肤中丰度排名前五的菌科分别为, 拟杆菌科 ( $28.35\% \pm 9.54\%$ )、艾克曼菌科 ( $19.81\% \pm 2.27\%$ )、噬几丁质菌科 (Chitinophagaceae,  $17.48\% \pm 5.31\%$ )、肠杆菌科 ( $12.19\% \pm 4.67\%$ )、红环菌科

(Rhodocyclaceae,  $3.80\% \pm 1.31\%$ )。Student’s *T*-检验, 拟杆菌科、艾克曼菌科、肠杆菌科的丰度在肠道及皮肤中无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 皮肤中噬几丁质菌科和伯克氏菌科 (Burkholderiaceae) ( $P \leq 0.001$ )及周蝶菌科 (Weeksellaceae) 和理研菌科 (Rikenellaceae) ( $P \leq 0.01$ )的丰度显著高于肠道, 肠道中毛



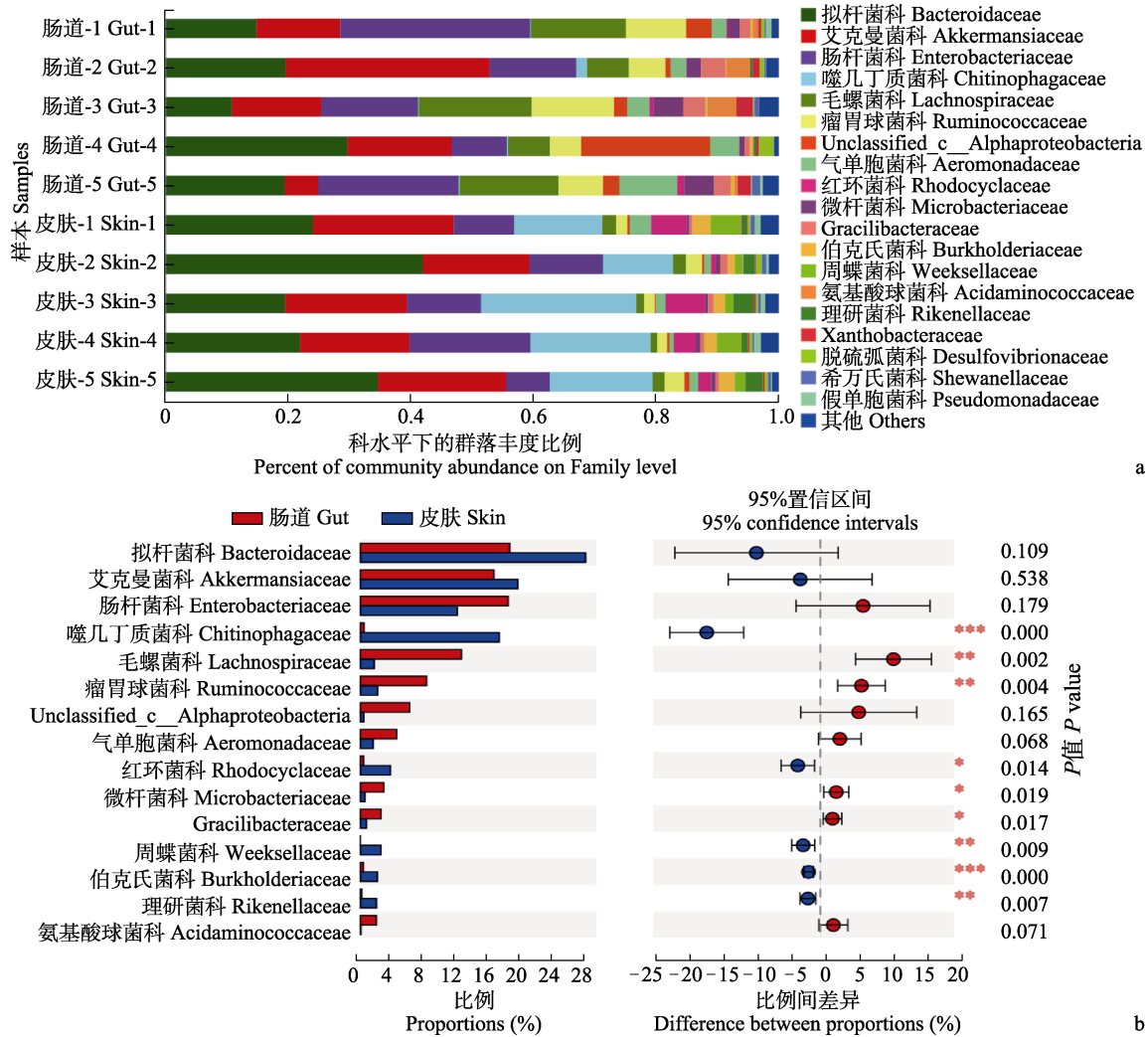


图 7 Gosner38 期林蛙科水平下肠道和皮肤微生物相对丰度的比较

Fig. 7 Comparison of relative abundance of gut and skin microbiota in the *R. chensinensis* at a family level

a. 群落相对丰度条形图, b. 肠道、皮肤微生物间群落组成差异。Student's *T*-检验, 星号表明存在统计学差异, \*  $0.01 < P \leq 0.05$ , \*\*  $0.001 < P \leq 0.01$ , \*\*\*  $P \leq 0.001$ 。

a. Community bar plot analysis of relative abundances. b. The differences in bacterial community composition between the gut and skin microbiota. Student's *T*-test, significant differences are marked with an asterisk, \*  $0.01 < P \leq 0.05$ , \*\*  $0.001 < P \leq 0.01$ , \*\*\*  $P \leq 0.001$ .

螺菌科和瘤胃球菌科的丰度显著高于皮肤 ( $P \leq 0.01$ ) (图 7b)。

此外, 对林蛙蝌蚪肠道和皮肤微生物属水平的相对丰度进行分析 (图 8a)。肠道中丰度排名前 5 的菌属为, 拟杆菌属 (*Bacteroides*,  $18.79\% \pm 7.05\%$ )、阿克曼菌属 (*Akkermansia*,  $16.8\% \pm 3.83\%$ )、*Tyzzerella\_3* 菌属 ( $12.47\% \pm$

$5.61\%$ )、克吕沃氏菌属 (*Kluyvera*,  $6.65\% \pm 1.51\%$ )、未分类- $\alpha$  变形菌属 (*unclassified\_c\_Alphaproteobacteria*,  $6.20\% \pm 1.16\%$ )。皮肤中丰度排名前 5 的菌属为, 拟杆菌属 ( $28.35\% \pm 9.54\%$ )、阿克曼菌属 ( $19.81\% \pm 2.27\%$ )、未分类-噬几丁质菌属 (*unclassified\_f\_Chitinophagaceae*,  $17.47\% \pm 2.43\%$ )、哈夫尼菌属-肥大杆菌属



(*Hafnia-Obesumbacterium*, 10.02% ± 1.33%)、丙酸弧菌属 (*Propionivibrio*, 3.76% ± 0.96%)。Student's *T*-检验, 拟杆菌属、阿克曼菌属的丰度在肠道及皮肤中无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 皮

肤中未分类-噬几丁质菌属 ( $P \leq 0.001$ )、丙酸弧菌属及哈夫尼菌属-肥大杆菌属 ( $P \leq 0.01$ )的丰度显著高于肠道, 肠道中 *Tyzzarella\_3* 菌属的丰度显著高于皮肤 ( $P \leq 0.01$ ) (图 8b)。

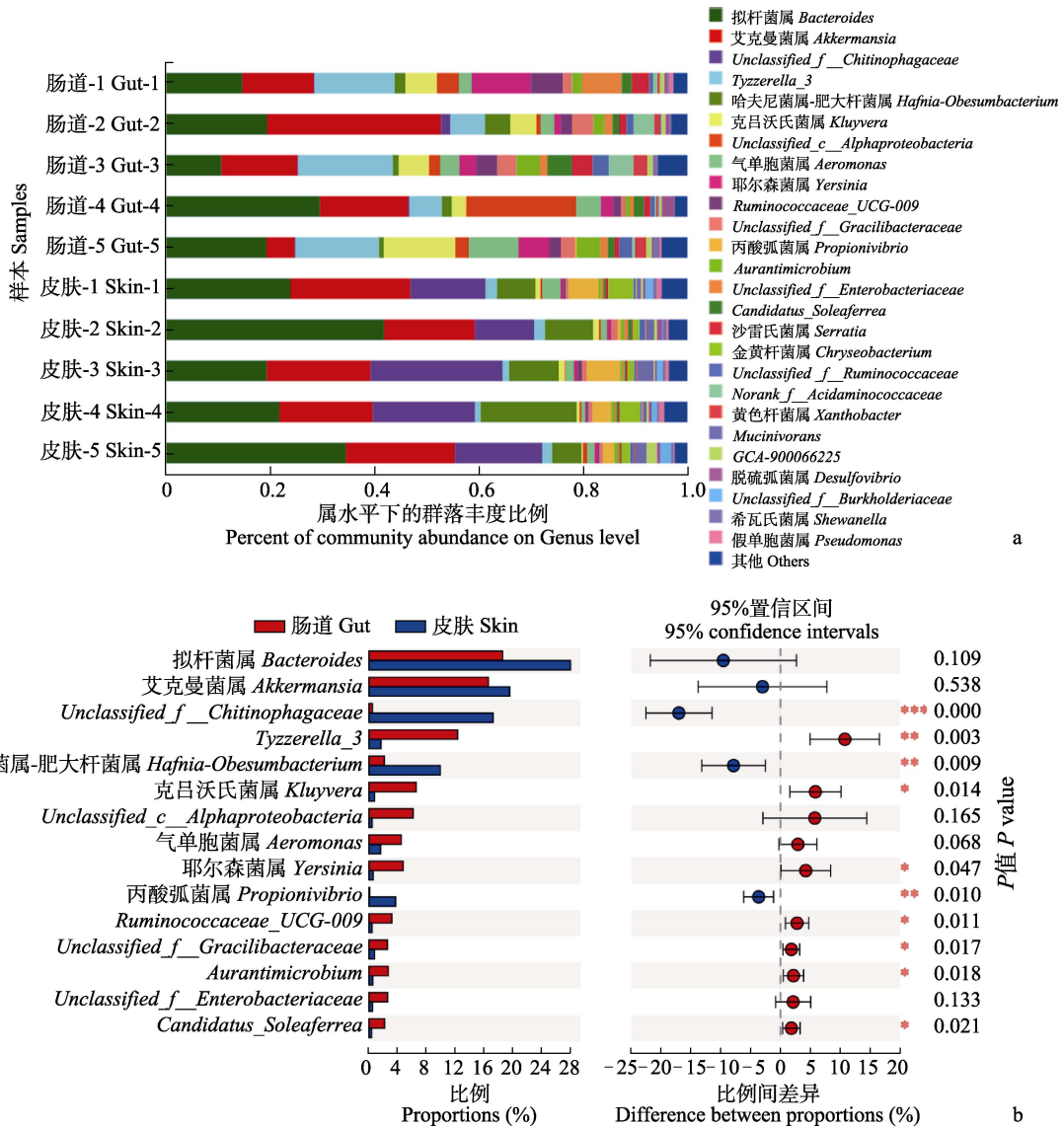


图 8 Gosner38 期林蛙属水平下肠道和皮肤微生物相对丰度的比较

Fig. 8 Comparison of relative abundance of gut and skin microbiota in the *R. chensinensis ata* genus level

a. 群落相对丰度条形图, b. 肠道、皮肤微生物间群落组成差异。Student's *T*-检验, 星号表明存在统计学差异, \*  $0.01 < P \leq 0.05$ , \*\*  $0.001 < P \leq 0.01$ , \*\*\*  $P \leq 0.001$ 。

a. Community bar plot analysis of relative abundances. b. The differences in bacterial community composition between the gut and skin microbiota. Student's *T*-test, significant differences are marked with an asterisk, \*  $0.01 < P \leq 0.05$ , \*\*  $0.001 < P \leq 0.01$ , \*\*\*  $P \leq 0.001$ .

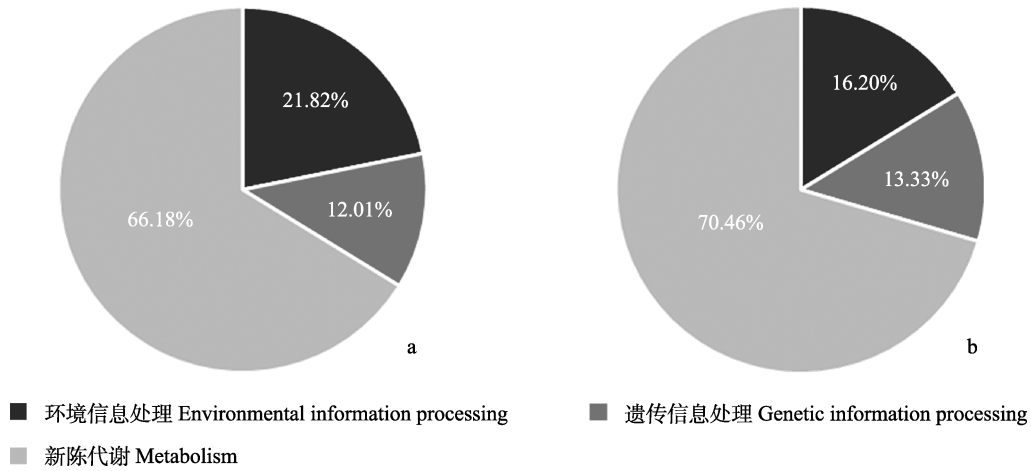


图9 中国林蛙一级功能水平下肠道和皮肤微生物的功能预测

Fig. 9 Functional prediction of gut and skin microbiota in the *Rana chensinensis* at a primary pathway level

KEGG 一级功能水平下的丰度饼图: a. 肠道; b. 皮肤。

The pie chart of function abundance at the KEGG pathway level 1: a. Gut; b. Skin.

## 2.7 微生物群落的功能预测

为研究中国林蛙蝌蚪肠道和皮肤中微生物功能的差异,使用 Tax4Fun 方法对微生物 16S rRNA 基因序列的功能进行了预测。肠道中“环境信息处理”、“遗传信息处理”及“新陈代谢”的丰度值分别为:  $21.82\% \pm 1.73\%$ 、 $12.01\% \pm 0.68\%$ 和  $66.18\% \pm 1.09\%$ ;而皮肤中这3种丰度值分别为:  $16.20\% \pm 0.68\%$ 、 $13.33\% \pm 0.23\%$ 和  $70.46\% \pm 0.46\%$ (图9)。蝌蚪肠道和皮肤二、三级功能水平的丰度值见附录1。Student's *T*-检验结果显示,肠道中“环境信息处理”功能的丰度显著高于皮肤,而皮肤中“遗传信息处理”及“新陈代谢”功能的丰度则显著高于肠道 ( $P \leq 0.01$ )。

## 3 讨论

本研究的组织学结果显示,中国林蛙蝌蚪肠道和皮肤的结构存在差异,肠黏膜中多为单层柱状的吸收细胞,少见杯状细胞;而皮肤中显示为复层扁平状的表皮,未见真皮。中国林蛙为两栖动物,其幼体阶段完全营水生生活。皮肤作为机体的外表面,可直接与外界环境接

触。而位于机体内部的肠道则主要对外界摄入的食物进行消化吸收,二者均为机体的重要物化屏障 (Coates et al. 2019)。因此,肠道和皮肤组织结构上的显著差异可能归因于其机能的不同。

此外, Gosner38 期中国林蛙蝌蚪肠道和皮肤之间微生物群落的多样性存在显著差异,而丰富度则相差不大。本研究的结果显示,肠道的香农指数显著高于皮肤,提示中国林蛙蝌蚪皮肤微生物多样性低于肠道。本研究的结果与哺乳动物的研究存在较大差异。不同采集地(污染/非污染)田鼠 (*Myodes glareolus*) 的皮肤微生物群落多样性均高于肠道 (Lavrinienko et al. 2018)。人类皮肤微生物群落的多样性在时间和空间上也显著高于肠道 (Costello et al. 2009, Flores et al. 2014)。Bletz 等 (2016) 及 Muletz 等 (2018) 的研究指出,外界环境的差异会对机体的肠道、皮肤微生物群落多样性产生影响。本文推测由于 Gosner38 期的蝌蚪处于水生生活阶段,其皮肤仅单一暴露于水生环境中,因此蝌蚪皮肤微生物的多样性要低于肠道。

同样地,  $\beta$  多样性分析结果显示,肠道及

皮肤的微生物群落之间存在差异。这些共生微生物对机体的免疫系统有着重要的调节作用，但其具体的调节机制又有所不同 (Coates et al. 2019)。因此，为了进一步分析肠道及皮肤微生物群落组成之间的差异，我们对其微生物的相对丰度及其差异的显著性进行了分析。在本研究中，高通量测序分析的结果显示，中国林蛙蝌蚪肠道微生物的优势门为变形菌门、厚壁菌门和拟杆菌门。这与前人对两栖动物肠道微生物的研究结果相似 (Kohl et al. 2013, Vences et al. 2016)。Huang 等 (2018) 及 Bletz 等 (2016) 对国内外不同栖息地两栖动物肠道微生物群落的比较分析表明，肠道中的优势门均为变形菌门、厚壁菌门和拟杆菌门。而对于皮肤微生物群落来说，其优势门为拟杆菌门、变形菌门、疣微菌门、厚壁菌门和放线菌门。有研究报道，内陆及沿海地区美国树蟾皮肤中微生物群落的优势门为变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门、放线菌门和疣微菌门 (Albecker et al. 2019)。上述结果表明，不同物种两栖动物肠道、皮肤微生物群落优势门的组成成分相似，而其丰度比例之间存在差异。

对中国林蛙蝌蚪皮肤及肠道微生物群落的差异性分析结果显示，皮肤中拟杆菌门的丰度显著高于肠道，而肠道中厚壁菌门和放线菌门的丰度显著高于皮肤，这些微生物群落丰度差异与组织或器官的结构和功能差异有关。已有研究表明，拟杆菌门广泛分布于地球上，常见于土壤、海洋和淡水中 (Thomas et al. 2011)，且多见于水生生物的皮肤中 (Legrand et al. 2018)。而蝌蚪的微生物群落组成普遍与鱼类相似 (Kohl et al. 2013)，这与本研究中蝌蚪所处发育时期 (Gosner 38 期) 的生活状态为水生一致。此外，在本实验中，蝌蚪的食物为煮熟的油麦菜。据报道，植物细胞壁中富含膳食纤维 (Williams et al. 2017)，会改善肠道环境，对动物的消化吸收和能量代谢产生多种有益的作用 (Makki et al. 2018)。厚壁菌门中的大部分类群都依赖于膳食纤维 (Sommer et al. 2016)。

故推测肠道中高水平的厚壁菌门有利于蝌蚪生理机能的发育。对于放线菌门来说，其作为肠道菌群的四个主要门类之一，虽然所占比值不大，但在维持肠道稳态方面起着关键的作用 (Ashida et al. 2012, Binda et al. 2018)。此外，放线菌门还参与了植物来源的碳水化合物的分解 (Pokusaeva et al. 2011) 以及机体的免疫炎症和自身免疫反应 (Lyons et al. 2010)。有关 15 种不同鱼类 (Givens et al. 2015) 的肠道微生物群落分析的结果显示，放线菌门为肠道中的优势门。在两栖动物类群中，通过对不同发育时期蟾蜍 (*Bufo gargarizans*) 肠道微生物群落的分析，结果显示蝌蚪肠道中放线菌门的丰度显著高于成体 (Chai et al. 2018)。因此，蝌蚪肠道中高水平的放线菌门有利于肠道稳态的维持以及对植物中营养物质的吸收。

在对中国林蛙蝌蚪肠道和皮肤微生物 KEGG 通路丰度的比较，肠道与皮肤的“环境信息处理”“遗传信息处理”及“新陈代谢”丰度之间存在显著差异。其中肠道“环境信息处理”功能的丰度显著高于皮肤。已有报道表明，微生物群落结构对环境变化非常敏感 (Zhao et al. 2018)。例如在湖泊 (Berdjeb et al. 2011)、海洋 (Dang et al. 2010) 以及水产养殖区中 (Zhang et al. 2006) 经常观测到环境因素对微生物群落的影响。而微生物群落功能组成的差异又会对宿主的生长发育产生影响。肠道中二级通路“信号转导”及“膜转运”功能的相对丰度较高，推测可能与肠道对食物的消化吸收以及对环境因子的处理有关。此外，皮肤中“遗传信息处理”及“新陈代谢”功能的丰度则显著高于肠道。值得注意的是，皮肤中“次生代谢产物的生物合成” (如吲哚生物碱、类黄酮及甜菜碱的生物合成) 及“脂质代谢” (如  $\alpha$ -亚麻酸代谢) 的丰度水平显著偏高。研究表明，吲哚生物碱 (陈瀛澜等 2017)、类黄酮 (钟宜科等 2019)、甜菜碱 (姜枚辰等 2019) 和  $\alpha$ -亚麻酸 (吴俏瑾等 2016) 均会对机体皮肤的保护及抗菌作用产生良好的效果。因此蝌蚪皮肤中这些功能丰

度的上调均会对蝌蚪在环境中的适应能力以及其生长发育产生有利影响。

本研究对中国林蛙蝌蚪肠道和皮肤的组织及其微生物群落进行了分析, 肠道和皮肤之间组织结构以及微生物群落多样性、组成成分和功能均存在显著差异。这种差异本质上是为了促进蝌蚪的一系列生长发育机能, 从而使其更容易适应外界环境的变化。

### 参 考 文 献

- Albecker M A, Belden L K, McCoy M W. 2019. Comparative analysis of anuran amphibian skin microbiomes across inland and coastal wetlands. *Microbial Ecology*, 78(2): 348–360.
- Ashida H, Ogawa M, Kim M, et al. 2012. Bacterial and host interactions in the gut epithelial barrier. *Nature Chemical Biology*, 8(1): 36–45.
- Barko P C, Mcmichael M A, Swanson K S, et al. 2018. The gastrointestinal microbiome: A review. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(1): 9–25.
- Belkaid Y, Segre J A. 2014. Dialogue between skin microbiota and immunity. *Science*, 346(6212): 954–959.
- Berdjeb L, Ghiglione J F, Domaizon I, et al. 2011. A 2-Year assessment of the main environmental factors driving the free-living bacterial community structure in Lake Bourget (France). *Microbial Ecology*, 61(4): 941–954.
- Binda C, Lopetuso L R, Rizzatti G, et al. 2018. Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. *Digestive and Liver Disease*, 50(5): 421–428.
- Bletz M C, Goedbloed D J, Sanchez E, et al. 2016. Amphibian gut microbiota shifts differentially in community structure but converges on habitat-specific predicted functions. *Nature Communications*, 7(1): 13699–13701.
- Chai L, Dong Z, Chen A, et al. 2018. Changes in intestinal microbiota of *Bufo gargarizans* and its association with body weight during metamorphosis. *Archives of Microbiology*, 200(7): 1087–1099.
- Coates M, Lee M J, Norton D, et al. 2019. The skin and intestinal microbiota and their specific innate immune systems. *Frontiers in Immunology*, 10: 2950.
- Colombo B M, Scalvenzi T, Benlamara S, et al. 2015. Microbiota and mucosal immunity in amphibians. *Frontiers in Immunology*, 6: 111.
- Costello E K, Lauber C L, Hamady M, et al. 2009. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*, 326(5960): 1694–1697.
- Dang H, Chen R, Wang L, et al. 2010. Environmental factors shape sediment anammox bacterial communities in hypereutrophic Jiaozhou Bay, China. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(21): 7036–47.
- Flores G E, Caporaso J G, Henley J B, et al. 2014. Temporal variability is a personalized feature of the human microbiome. *Genome Biology*, 15(12): 531.
- Fu R, Niu R, Li R, et al. 2020. Fluoride-induced alteration in the diversity and composition of bacterial microbiota in mice colon. *Biological Trace Element Research*, 196(2): 537–544.
- Gallo R L. 2017. Human skin is the largest epithelial surface for interaction with microbes. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(6): 1213–1214.
- Ghazalpour A, Cespedes I, Bennett B J, et al. 2016. Expanding role of gut microbiota in lipid metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, 27(2): 141–147.
- Givens C E, Ransom B, Bano N, et al. 2015. Comparison of the gut microbiomes of 12 bony fish and 3 shark species. *Marine Ecology Progress Series*, 518(7): 209–223.
- Gosner K L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16: 183–190.
- Heijtz R D, Wang S, Anuar F, et al. 2011. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(7): 3047–3052.
- Huang B H, Chang C W, Huang C W, et al. 2018. Composition and functional specialists of the gut microbiota of frogs reflect habitat differences and agricultural activity. *Frontiers in Microbiology*, 8: 2670.
- Kohl K D, Cary T L, Karasov W H, et al. 2013. Restructuring of the

- amphibian gut microbiota through metamorphosis. *Environmental Microbiology Reports*, 5(6): 899–903.
- Kueneman J G, Parfrey L W, Woodhams D C, et al. 2014. The amphibian skin-associated microbiome across species, space and life history stages. *Molecular Ecology*, 23(6): 1238–1250.
- Lavrinenko A, Tukulenko E, Mappes T, et al. 2018. Skin and gut microbiomes of a wild mammal respond to different environmental cues. *Microbiome*, 6(1): 209.
- Legrand T P R A, Catalano S R, Wos-Oxley M L, et al. 2018. The inner workings of the outer surface: skin and gill microbiota as indicators of changing gut health in yellowtail kingfish. *Frontiers in Microbiology*, 8: 2664.
- Liu R, Zhang Y, Gao J, et al. 2020. Effects of octylphenol exposure on the lipid metabolism and microbiome of the intestinal tract of *Rana chensinensis* tadpole by RNAseq and 16s amplicon sequencing. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 197: 110650.
- Lyons A, O'Mahony D, O'Brien F, et al. 2010. Bacterial strain-specific induction of Foxp3+ T regulatory cells is protective in murine allergy models. *Clinical And Experimental Allergy*, 40(5): 811–819.
- Makki K, Deehan E C, Walter J, et al. 2018. The impact of dietary fiber on gut microbiota in host health and disease. *Cell Host & Microbe*, 23(6): 705–715.
- McKenzie V J, Bowers R M, Fierer N, et al. 2012. Co-habiting amphibian species harbor unique skin bacterial communities in wild populations. *ISME Journal*, 6(3): 588–596.
- Mowat A M, Agace W W. 2014. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews Immunology*, 14(10): 667–685.
- Mu D Y, Meng J H, Bo X X, et al. 2018. The effect of cadmium exposure on diversity of intestinal microbial community of *Rana chensinensis*, tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 154: 6–12.
- Muletz W C R, Yarwood S A, Campbell G E H, et al. 2018. Effects of host species and environment on the skin microbiome of plethodontid salamanders. *Journal of Animal Ecology*, 87(2): 341–353.
- Palm N W, Zoete MR D, Flavell R A. 2015. Immune-microbiota interactions in health and disease. *Clinical Immunology*, 159(2): 122–127.
- Pokusaeva K, Fitzgerald G F, van Sinderen D. 2011. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes & Nutrition*, 6(3): 285–306.
- Rangan K J, Hang H C. 2017. Biochemical mechanisms of pathogen restriction by intestinal bacteria. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(11): 887–898.
- Round J L, Mazmanian S K. 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9(5): 313–323.
- Sanford J A, Gallo R L. 2013. Functions of the skin microbiota in health and disease. *Seminars in immunology*, 25(5): 370–377.
- Schommer N N, Gallo R L. 2013. Structure and function of the human skin microbiome. *Trends in Microbiology*, 21(12): 660–668.
- Semova I, Carten J D, Stombaugh J, et al. 2012. Microbiota regulate intestinal absorption and metabolism of fatty acids in the zebrafish. *Cell Host & Microbe*, 12(3): 277–288.
- Sommer F, Ståhlman M, Ilkayeva O, et al. 2016. The gut microbiota modulates energy metabolism in the hibernating brown bear *Ursus arctos*. *Cell Reports*, 14(7): 1655–1661.
- Thomas F, Hehemann J H, Rebuffet E, et al. 2011. Environmental and gut bacteroidetes: the food connection. *Frontiers in Microbiology*, 2: 93.
- Tojo R, Suárez A, Clemente M G, et al. 2014. Intestinal microbiota in health and disease: role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World Journal of Gastroenterology*, 20(41): 15163–15176.
- Tuddenham S, Sears C L. 2015. The intestinal microbiome and health. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 28(5): 464–470.
- Vences M, Lyra M L, Kueneman J G, et al. 2016. Gut bacterial communities across tadpole ecomorphs in two diverse tropical anuran faunas. *Naturwissenschaften*, 103(3/4): 25.
- Wang X C, Bo X X, Yao Q, et al. 2019. The effect of fluorine exposure on morphological indicators and intestinal microbial community in *Bufo gargarizans* tadpoles. *Ecological Indicators*, 98: 763–771.
- Williams B A, Grant L J, Gidley M J, et al. 2017. Gut fermentation of

dietary fibres: physico-chemistry of plant cell walls and implications for health. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10): 2203.

Yao Q, Yang H, Wang X, et al. 2019. Effects of hexavalent chromium on intestinal histology and microbiota in *Bufo gargarizans* tadpoles. *Chemosphere*, 216: 313–323.

Zhang C Y, Wang Y G, Rong X J. 2006. Isolation and identification of causative pathogen for skin ulcerative syndrome in *Apostichopus japonicas*. *Journal of Fisheries of China*, 30(1): 118–123.

Zhao Z, Pan Y, Jiang J, et al. 2018. Unrevealing variation of microbial communities and correlation with environmental variables in a full culture-cycle of *Undaria pinnatifida*. *Marine Environmental Research*, 139: 46–56.

Zheng R, Chen X, Ren C, et al. 2020. Comparison of the characteristics of intestinal microbiota response in *Bufo gargarizans* tadpoles: Exposure to the different environmental chemicals (Cu, Cr, Cd and NO<sub>3</sub>-N). *Chemosphere*, 247: 125925.

陈瀛澜, 郝艳艳, 郭夫江, 等. 2017. 蟾酥化学成分及药理活性研究进展. *中草药*, 48(12): 2579–2588.

姜枚辰, 张得钧. 2019. 甜菜碱的提取纯化及活性研究进展. *药学研究*, 38(1): 46–48.

刘文舒, 陈彦良, 郭小泽, 等. 2020a. 虎纹蛙肠道微生物结构与功能分析. *野生动物学报*, 41(1): 171–181.

刘文舒, 郭小泽, 陈彦良, 等. 2020b. 养殖黑斑蛙 (*Rana nigromaculata* Howell) 肠道微生物结构与功能分析. *经济动物学报*. [J/OL]. [2020-09-16]. <https://doi.org/10.13326/j.jea.2019.1415>.

吴俏槿, 杜冰, 蔡尤林, 等. 2016.  $\alpha$ -亚麻酸的生理功能及开发研究进展. *食品工业科技*, 37(10): 386–390.

钟宜科, 吴迪, 花晓丹, 等. 2019. 黄酮类化合物抑菌作用研究进展. *中国食品添加剂*, 30(8): 166–171.

附录 1 中国林蛙蝌蚪肠道和皮肤微生物的功能预测

Appendix 1 Functional prediction of gut and skin microbiota in the *Rana chensinensis*

1 级通路 Pathway level 1	2 级通路 Pathway level 2	3 级通路 Pathway level 3	描述 Description	皮肤 Skin	肠道 Gut
环境信息处理 Environmental Information Processing	膜转运 Membrane transport	ko02010	ABC 转运蛋白 ABC transporters	0.053 991	0.091 085
		ko02060	磷酸转移酶系统 Phosphotransferase system	0.002 076	0.007 032
		ko03070	细菌分泌系统 Bacterial secretion system	0.010 914	0.019 758
	信号转导 Signal transduction	ko02020	细菌双组分调节系统 Two-component system	0.080 924	0.082 262
		ko04011	MAPK 信号通路-酵母 MAPK signaling pathway-yeast	0.000 412	0.000 435
		ko04020	钙信号通路 Calcium signaling pathway	$5.782\ 713 \times 10^{-6}$	$7.984674 \times 10^{-6}$
		ko04064	NF- $\kappa$ B 信号通路 NF-kappa B signaling pathway	$1.571\ 346 \times 10^{-7}$	$4.663\ 179 \times 10^{-7}$
		ko04310	Wnt 信号通路 Wnt signaling pathway	$3.173\ 247 \times 10^{-6}$	$3.433\ 954 \times 10^{-6}$
ko04330	Notch 信号通路 Notch signaling pathway	$3.173\ 247 \times 10^{-6}$	$3.433\ 954 \times 10^{-6}$		
遗传信息处理 Genetic Information Processing	复制和修复 Replication and repair	ko03420	核苷酸切除修复 Nucleotide excision repair	0.010 302	0.008 039
		ko03430	错配修复 Mismatch repair	0.010 321	0.008 420
		ko03440	同源重组 Homologous recombination	0.013 833	0.011 921

## 续附录 1

1 级通路 Pathway level 1	2 级通路 Pathway level 2	3 级通路 Pathway level 3	描述 Description	皮肤 Skin	肠道 Gut
新陈代谢 Metabolism	其他次生代谢产物的生物合成 Biosynthesis of other secondary metabolites	ko00901	吲哚生物碱的合成 Indole alkaloid biosynthesis	$8.348\ 573 \times 10^{-6}$	$2.426\ 424 \times 10^{-5}$
		ko00940	苯丙烷的生物合成 Phenylpropanoid biosynthesis	0.003 637	0.001 646
		ko00941	类黄酮的生物合成 Flavonoid biosynthesis	$3.626\ 592 \times 10^{-5}$	$1.622\ 192 \times 10^{-5}$
		ko00944	黄酮和黄酮醇的合成 Flavone and flavonol biosynthesis	0.000 359	0.000 129
		ko00950	异喹啉生物碱的生物合成 Isoquinoline alkaloid biosynthesis	0.000 223	0.000 25
		ko00965	甜菜色素的生物合成 Betalain biosynthesis	$8.696\ 258 \times 10^{-6}$	$2.290\ 340 \times 10^{-5}$
	糖的生物合成和代谢 Glycan biosynthesis and metabolism	ko00531	糖胺聚糖降解 Glycosaminoglycan degradation	0.005 892	0.002 130
		ko00603	糖鞘脂的生物合成 Glycosphingolipid biosynthesis-globo and isoglobo series	0.002 535	0.001 228
		ko00604	糖鞘脂的生物合成 Glycosphingolipid biosynthesis-ganglio series	0.001 449	0.000 528
		ko00592	$\alpha$ -亚麻酸代谢 alpha-Linolenic acid metabolism	$6.850\ 552 \times 10^{-5}$	0.000 206
脂质代谢 Lipid metabolism	外源生物的降解与代谢 Xenobiotics biodegradation and metabolism	ko00791	莠去津降解 Atrazine degradation	0.000 413	0.000 710
		ko00909	倍半萜类和三萜类生物合成 Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis	$4.496\ 549 \times 10^{-5}$	0.000 152

前两列分别为 KEGG pathway level 3 对应的 KEGG pathway level 1 和 level 2 的功能名称。第三列为预测到 KEGG pathway level 3 水平的功能编号，第 4 列为其对应的功能描述。其余两列分别为 KEGG pathway level 3 水平对应的功能在皮肤和肠道样本中的丰度值。

The first two columns show the function names of KEGG pathway level 1 and level 2 corresponding to KEGG pathway level 3, respectively. The third column shows the code for KEGG pathway level 3, and the fourth column shows the function description corresponding to the third column. The remaining two columns show the abundance values of the functions corresponding to KEGG pathway level 3 in skin and gut samples, respectively.