

文章编号: 1004-0374(2010)12-1247-07

肥胖相关的肠道微生物群落结构动力学与功能解析研究

赵立平*, 张晨虹

(上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240)

摘要: 肥胖及相关的慢性代谢性疾病近年来已经成为威胁全球的公共健康问题。越来越多的证据表明, 在宿主的营养、免疫和代谢中有不可替代的作用的肠道菌群不仅可以通过调节宿主脂肪吸收存储相关的基因, 影响后者的能量平衡, 更重要的是其结构失调导致宿主循环系统中内毒素增加, 诱发慢性、低水平炎症, 导致肥胖和胰岛素抵抗。运用微生物分子生态学、元基因组学和代谢组学的方法, 揭示与代谢性疾病相关的菌群结构失调, 并鉴定出相关的特定细菌类群及其功能, 使得通过以菌群为靶点的营养干预手段防止慢性代谢性疾病成为可能, 将带来代谢性疾病预防和控制策略的革命性的变化。

关键词: 肠道菌群; 内毒素; 肥胖; 代谢性疾病

中图分类号: R37; R58

文献标识码: A

Functional dynamics of gut microbiota in obesity and metabolic diseases

ZHAO Li-ping*, ZHANG Chen-hong

(Shanghai Center for Systems Biomedicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: The prevalence of obesity-related metabolic disorders has become a challenge to public health around the world. As the second genome, gut microbiome can modulate the nutrition, metabolism and immunity of host. Emerging evidence indicates that gut microbiota may thus play an important mediating role between diet, life style and host genetics in development of obesity and eventually many forms of metabolic diseases. Diet-disrupted gut microbiota can lead to increased level of endotoxin, provoke the chronic inflammation and then induce obesity and insulin resistant. Research along this line to reveal the shift of gut microbiota and identify the specific functional groups of bacteria, may lead to discovery of new therapeutic targets and revolutionary strategies for predictive, preventive and personalized management of metabolic disorders.

Key words: gut microbiota; endotoxin; obesity; metabolic diseases

众所周知, 肥胖已经成为现代社会面临的严重公共健康问题。根据世界卫生组织(WTO)2006年公布的数据, 全球已经有超过10亿的成年人超重(BMI 25.0~29.9 kg/m²), 其中有3亿人为肥胖症患者(BMI>30 kg/m²)。发达国家和发展中国家肥胖人口的比例都在不断上升, 与肥胖相关的代谢失调疾病如2型糖尿病、冠心病、动脉粥样硬化及非酒精性脂肪肝等许多慢性代谢性疾病也有愈演愈烈的趋势^[1]。如何遏制和治疗肥胖及相关代谢性疾病, 成为亟待解决的公共健康问题。大多数代谢失调都与糖稳态失衡有关, 继而发展成为2型糖尿病、高血压、动脉粥样硬化等^[2]。一方面, 大量的营养学临床实验

和流行病学调查表明, 肥胖等慢性疾病的快速增长是由于摄入能量过多导致的能量代谢不平衡, 特别是由传统的植物为主的饮食转变为动物性食物为主的西方饮食造成的^[3]。另一方面, 近十年来的研究清楚的揭示了与肥胖相伴随的慢性炎症在糖尿病等疾病发生发展中的关键作用^[4]。但是, 仅仅从人或动物自身的生理机制解释高脂或高能量饮食引起慢

收稿日期: 2010-04-14

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30730005)

*通讯作者: E-mail: lpzhao@sjtu.edu.cn

性低水平炎症是相当困难的。如何才能揭示摄入高脂或高能量饮食与低水平、全身性炎症的发生的分子机理, 以及由于慢性炎症导致的代谢综合征的分子机理呢?

近几年来, 越来越多的研究成果将人们的注意力吸引到与人类共生的肠道微生物群落和其宿主的相互作用上来了。肠道菌群与宿主的消化、营养、代谢、免疫等方面密切相关, 是进入人体的“环境”因素, 其地位与作用相当于后天获得的一个重要“器官”^[5]。尽管对肠道菌群的多样性和功能的认识还不全面, 现在已知正常成年人的肠道内的总重量有1~2 kg, 包含约500~1 000个不同的种类, 其细胞总量几乎是人体自身细胞的10倍, 其编码的基因数量为是人体自身基因的100多倍^[6,7]。如此数量庞大的微生物群体, 通过长期与宿主的共同进化, 为宿主提供不具备的酶和生化代谢通路。肠道菌群的基因组信息的总和被称为“肠道元基因组”(gut metagenome), 是控制人体健康的“人类第二基因组”, 与人体的基因组一起, 通过与环境条件的相互作用, 影响着人体的生理代谢。因此, 人体是一个由大量真核细胞与原核细胞共同构成的复杂系统, 正如诺贝尔奖获得者Lederberg形容的“超级生物体(superorganism)”^[8]。

肠道菌群在宿主能量代谢的调控中有着不可忽视的作用。很早人们就认识到肠道微生物区系的一个主要的代谢功能就是发酵那些不能被小肠吸收的食物残渣和上皮细胞分泌的内生黏液^[9]。肠道内微生物群落的基因多样性为这个复杂系统提供了很多宿主不具备的酶和生化代谢通路, 使其可以通过发酵降解多糖(淀粉、纤维素、半纤维素、胶质)、没有被吸收的寡糖来产生能量, 而代谢的终极产物是短链脂肪酸^[10]。这些复杂代谢活动的结果就是产生能被宿主吸收和利用的能量和底物, 并且为微生物自身的生长和增殖提供能量和营养物质。也就是说, 肠道菌群可以通过帮助消化利用宿主自己不能利用的营养物质, 使宿主获得更多能量。

更令人吃惊的是, 美国的Jeffery I. Gordon领导的小组研究表明, 肠道菌群的作用不仅仅是帮助宿主从食物中获得更多能量, 更为重要的是可以直接调节宿主脂肪存储组织的基因表达活性, 使宿主增加脂肪的积累^[5]。他们通过对无菌小鼠(GF)和肠道内定植正常菌群的普通小鼠(CONV-R)的比较, 研究肠道菌群对宿主的代谢, 特别是对脂肪存储的

影响。在给予相同的多糖丰富的食物(57%碳水化合物, 5%脂肪)的情况下, CONV-R小鼠与GF小鼠相比, 身体脂肪总量增加42%, 而每天食物消耗却减少29%。这组数据似乎只是证实了肠道菌群能够帮助宿主消化多糖而获得更多的能量。但接下来的分析却证实了肠道菌群与宿主脂肪代谢的关系决不仅限于此。CONV-R小鼠相对GF小鼠身体脂肪总量增加反映的是脂肪细胞显著的过度肥大, 而非其数量的增加。菌群的定植增加了宿主肠道内葡萄糖的吸收以及血清中的葡萄糖和胰岛素含量, 从而增加了两种基础转录因子——ChREBP和SREBP-1——的表达, 进而诱导了肝脏的脂肪合成。微生物发酵产生的短链脂肪酸可以刺激肝脏中脂肪代谢相关的酶。甘油三酯通过脂蛋白脂肪酶(LPL)的中介作用, 从肝脏进入循环系统, 进而被脂肪细胞吸收。肠上皮细胞可以产生一种LPL的抑制因子——禁食诱导脂肪细胞因子(Fiaf), 而肠道菌群能够调控Fiaf的表达。通过比较GF及CONV-R的野生型和Fiaf^{-/-}小鼠, 证实了Fiaf是体内具有重要生理作用的LPL调控因子, 而且是菌群诱导的脂肪存储(肥胖)增加的重要中介因子。这一系列的研究, 首次有利地证明了肠道菌群作为一种环境因素, 参与宿主脂肪存储的调控, 是肥胖发生的重要原因。

肥胖对宿主肠道微生态影响很大, 肠道菌群的数量与组成会发生很大改变。一方面, 肥胖个体的肠内细菌过度生长可能性较高, 主要可能与肥胖改变了肠的运动性有关, 比如肥胖病人易患肠易激综合征和假性结肠梗阻^[11,12]。还有证据表明, 由于肥胖改变了机体对某些神经肽如缩胆囊肽、铃蟾肽等的敏感性, 从而影响了肠的运动性^[13,14]。肠道菌群可以产生和代谢乙醇, 对宿主乙醇代谢的研究可以表明肥胖个体肠内细菌的过度生长^[15,16]。遗传型肥胖的ob/ob型小鼠与瘦型小鼠相比, 其呼出的气体中乙醇含量较高^[17], 而对肥胖患者的临床研究中也得出相一致的结论^[18]。另一方面, 肥胖会改变肠道菌群结构和组成。Gordon和他的同事分析了5 088个来自于相同饮食结构的遗传性肥胖小鼠(ob/ob)和瘦型小鼠(ob/+, +/+)肠道末端微生物的16S rRNA基因序列, 发现肥胖小鼠肠道中拟杆菌门细菌的丰度下降50%, 而厚壁菌门细菌的比例升高^[19]。对人体的研究获得与动物实验一致的结果, 12名肥胖患者在坚持减少碳水化合物的低热量食谱1年, 体重明显下降后, 他们肠道中的拟杆菌门微生物的丰

度逐渐升高,而厚壁菌门微生物的比例下降^[20]。若将肥胖小鼠(*ob/ob*)的肠道菌群移植至野生型GF小鼠体内,仅经过两周受体小鼠就会因为增加食物中摄取的能量而引起体重显著增加。因此肥胖表型可以随菌群在不同个体间发生转移,菌群元基因组对肥胖表型的贡献十分重要^[19]。

在肠道菌群与宿主相互作用中,微生物影响和改变宿主的代谢绝不仅仅是使宿主获得更多的能量这么简单。最近通过对GF小鼠的研究,分析了其能够抵抗高脂饮食诱导肥胖的机理^[21]。研究人员通过用高脂高碳水化合物的饲料喂养GF小鼠和CONV-R小鼠,发现后者的体重和脂肪含量显著高于前者,而且GF小鼠对于高脂饲料诱导的糖耐受和胰岛素抵抗都有一定抵抗作用。这种抵抗的分子机理涉及两个独立的调控脂肪酸代谢的途径:肠道菌群的定植一方面使得Fiaf的水平降低,诱导了过氧化物酶体增殖物激活受体辅助激活因子Pgc-1 α 与棕色脂肪细胞的分化及其生理功能关系密切的辅助转录激活因子;另一方面降低了AMP活化蛋白激酶(AMPK)这一控制细胞能量代谢的关键酶的活性。这说明肠道菌群在饮食诱导的肥胖和糖尿病发生发展中的作用涉及复杂的分子机理,而不仅仅是增加了能量的获取。

虽然上述研究揭示了肠道菌群通过调控宿主脂肪存贮的相关基因和代谢通路发挥重要的作用,但是却不能说明高脂饮食诱导的肥胖等代谢综合症中普遍存在的低水平慢性炎症与肠道菌群是否有关。

高脂饮食诱导的肥胖和代谢综合症与肌肉、肝脏和脂肪组织中多种炎症反应相关因子的表达量增加有关,比如IL-1、TNF- α 、MCP-1和IL-6等。这些标记物都参与破坏胰岛素功能和胰岛素抵抗形成的过程^[22-24]。如炎症因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平上升,能够促进胰岛素受体底物I的丝氨酸位磷酸化。磷酸化导致胰岛素受体底物I对胰岛素敏感性下降,引发胰岛素抵抗^[23]。近来,Cani等人找到了一类细菌相关的因子——脂多糖(LPS),将高脂饮食与代谢性综合症联系起来,对于肠道菌群与代谢稳态平衡之间的关系提出了新的假说^[25]。LPS是革兰氏阴性菌细胞壁成分,死亡的革兰氏阴性菌的LPS与LBP形成复合物并被免疫细胞表面的CD14/TLR4受体识别时,会引起促炎因子的分泌,也被称为内毒素^[26]。也是通过TLR4相关途径,LPS从肠腔经小肠微血管进入宿主循环系统,其在体内

转运及代谢与脂蛋白相关^[27,28]。研究人员通过短时间(2~4周)高脂食物饲喂小鼠发现其体内LPS水平显著升高,但是仍然远远低于败血症个体中的水平,称为代谢性内毒素血症。同时,与用小鼠标准饲料(富含碳水化合物)喂养的动物相比,高脂组小鼠肠道内的*Bifidobacterium*spp.和*E. rectale-Cl. coccooides*类群的数量显著下降,其中重要的是*Bifidobacterium*spp.能够提高肠屏障功能和降低小肠内毒素水平^[29,30]。为了证明LPS是触发代谢失调的因子,给小鼠注射低剂量的提纯的LPS,使其血液中内毒素水平与高脂组相同。实验数据证明,上述两组动物空腹血糖、肥胖、脂肪变性、脂肪组织巨噬细胞浸润、肝脏胰岛素抵抗、高胰岛素血症等生理改变相似。LPS的重要受体CD14是在单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞表面表达的一种复合功能的受体蛋白^[31],给CD14基因敲除小鼠饲喂高脂饲料或注射低剂量LPS,则不会诱发代谢失调的症状,并且正常饲料喂养的CD14基因敲除小鼠对胰岛素的敏感性增加^[25]。如果小鼠在饲喂高脂饲料的同时服用抗生素,则由于抗生素对肠道菌群的影响,减少了代谢性内毒素水平,从而避免了代谢性失调的症状如脂肪组织发炎、巨噬细胞浸润、氧化应激等^[32]。Cani等的上述研究有力的证明了肠道菌群产生的内毒素与高脂饮食诱导的代谢失调密切相关。不仅在动物模型中,在肥胖和2型糖尿病人群研究中代谢性内毒素血症假说也得到一定的验证。Creely等^[33]通过BMI、性别、年龄配对的病例一对照研究发现,2型糖尿病患者内毒素水平比正常人高2倍,而且正常人禁食后胰岛素水平与其内毒素水平相关。

与之相关的研究更发现,遗传性肥胖小鼠(*ob/ob*和*db/db*)血液中的LPS水平较之野生型小鼠升高^[34]。而且用特异性抑制革兰氏阴性菌的多黏菌素B处理大鼠,降低了肝脏脂肪变性^[35]。用抗生素处理*ob/ob*小鼠4周后,宿主体内的内毒素减少,炎症及代谢失调相关的反应降低。用两种方式切断*ob/ob*小鼠体内LPS反应途径——使用LPS活性抑制剂和CD14敲除——发现动物生理反应与使用抗生素相似^[32]。以上的研究表明,肠道菌群相关的代谢性内毒素在遗传型肥胖动物的代谢失调中也发生着关键作用。

另一方面,既然*Bifidobacterium*spp.数量与宿主内毒素水平、炎症反应都密切相关,Cani等通过使用益生元(寡果糖)维持*Bifidobacterium*spp.数量不下降,明显降低肠道通透性,则小鼠可以抵抗高脂

饮食诱导的内毒素水平升高及肥胖等代谢失调^[36]。其分子机制被证明是，益生元的摄入导致 *Bifidobacterium* spp. 数量增加，使得与肠粘膜功能、肠上皮细胞增殖和分化密切相关的 GLP-2 表达增加，进而增加 ZO-1、Occludin 等的表达，肠壁通透性下降，进入宿主循环系统的肠道内 LPS 减少，从而减轻宿主的炎症反应^[37]。

因此，代谢性内毒素血症假说可以很好地解释高脂或高能量饮食引起慢性低水平炎症的机制——饮食诱导肠道菌群改变，增加了病菌的数量，减少了保护肠屏障细菌的数量，影响肠上皮细胞基因表达，导致肠道通透性增加，使得进入血液的内毒素增加，引发慢性炎症反应，进而产生肥胖、胰岛素抵抗等代谢失调。

以上的研究提供了大量证据，表明不当饮食引起的肠道菌群失调在代谢性综合征发生发展中扮演了极为重要的角色。

元基因组与宿主基因组相比，最大的特点就是其结构具有很高的可塑性。肠道菌群结构的可塑性使之成为防治代谢性疾病很好的靶点。超级生物体可以被看作是一个会“走路”的生物反应器，类似处理废水的连续流动培养装置。因此，改变进入反应器的培养基的营养组成是改变其中微生物组成的有效方法^[38, 39]。如果要以肠道菌群作为防治相关疾病的靶点，就必须找出与宿主该疾病相关的特定细菌类群，并且解析相关细菌类群如何影响宿主代谢活性，才能有针对性的进行干预和调控。

目前微生物分子生态学和元基因组学在分析肠道菌群结构组成中已广泛应用。微生物分子生态学是以微生物的基因组 DNA 为分析对象，用 DNA 的序列多样性反映物种的多样性，从而克服了培养方法的局限性，可以比较客观、全面、快速地分析菌群的结构组成，可以实现对同一个体肠道菌群结构随疾病发生发展而变化的动态跟踪研究，也可以对健康和疾病患者进行比较分析^[40]。PCR-DGGE 和 T-RFLP 等 DNA 指纹图谱的分子生态学技术能快速直观地展现微生物群落结构的变化^[41, 42]。随着测序技术的不断提高、测序成本的降低、生物信息学的大力发展，利用高通量、大规模的新一代测序技术，如 454 焦磷酸测序等，可以对肠道元基因组进行深度测序，更直接地获得肠道微生物组成和功能的信息^[43, 44]。高通量测序数据结合多变量统计方法，如主成分分析 (PCA)、偏最小二乘判别法 (PLS-

DA) 等，使得鉴定出与宿主代谢性疾病相关的特定细菌类群成为可能^[45]。非常典型的例子就是我们实验室以小鼠为模型，评价宿主基因和饮食在改变肠道菌群结构和调控代谢综合征相关表型中的相对贡献的研究^[46]。该实验将天生表现出葡萄糖耐受异常 (IGT) 和体脂增加的 *Apoa-I* 基因敲除小鼠和野生型小鼠以高脂饲料或普通饲料饲养 25 周，以模拟人类代谢性疾病的发生过程。其中摄入高脂饲料的 *Apoa-I* 基因敲除小鼠和野生型小鼠体重明显高于普通饲料组并且表现出葡萄糖代谢异常 (IGT)，而饲喂正常饲料的 *Apoa-I* 基因敲除小鼠体重增长不明显，但是同样表现出 IGT。在四组动物中，饲喂正常饲料的野生型小鼠最为健康，意外的是，肥胖和 IGT 最严重的并非饲喂高脂饲料的 *Apoa-I* 基因敲除小鼠，而是饲喂高脂饲料野生型动物，其摄入的高脂饲料显著多于前者。我们首先采用 PCR-DGGE 和 T-RFLP 两种 DNA 指纹图谱技术对小鼠肠道菌群整体结构进行描述，发现饮食结构的不同能够解释 57% 的肠道菌群的变异，而宿主基因型的不同对肠道菌群的贡献不足 12%。所有表现出 IGT 的三组动物的肠道菌群都与表型健康的饲喂普通饲料的野生型动物的肠道菌群有显著差异。然后我们采用 bar-coded 焦磷酸测序的方法对 16S rRNA 基因 V3 区进行深度测序，结合偏最小二乘法判别分析鉴定出与代谢综合征发生发展相关的特定细菌类群。我们在种的水平上，共鉴定出 65 个细菌类群与饮食结构差异、宿主基因型差异或宿主健康状况相关。值得注意的是，无论基因型如何，摄入高脂饲料会使得具有保护肠屏障功能的 *Bifidobacterium* spp. 丰度下降。*Desulfovibrionaceae* 是一类能够还原硫酸盐并且产生内毒素的菌，该类群产生的硫化氢可以损伤肠黏膜影响肠屏障功能，而内毒素进入宿主循环系统可以诱发宿主免疫反应^[47-49]。一个属于该科的类群在表现出 IGT 的动物中增加，特别是热量摄入最多、代谢综合征最严重的饲喂高脂饲料的野生型小鼠肠道中丰度最高。该研究表明饮食结构对于决定肠道菌群结构具有最重要的作用，不当饮食会引起特定细菌类群的变化，即使动物拥有正常的基因组，也会由于肠道菌群失调发展成为代谢综合征。该研究也鉴定出可能与慢性炎症和代谢性疾病相关的特定细菌类群，为在人类中研究肠道菌群与慢性代谢性疾病的关系和进行以肠道菌群为靶点的饮食干预提供了借鉴。

要有效的通过调控肠道菌群来干预慢性代谢性疾病的发生发展,仅仅鉴定出与之相关的细菌类群是不够的,还必须解析微生物与宿主之间互作关系的分子基础以及其中细菌成员的功能,为此我们提出了一种将肠道菌群与宿主代谢表型变化加以联系的“跨基因组”方法^[50]。结合波谱学、微生物组学和多变量统计学,分析7位中国家庭成员两个时间点采集的粪便和尿液样品,并模拟肠道菌群与宿主的代谢相关性。通过构建粪便肠道菌群的16S rRNA基因克隆文库分析了该家庭7位成员肠道菌群的多样性和组成结构。在种的水平,我们发现中国家庭成员肠道菌群的整体结构与之前已报道的美国人有着显著的差异,这一结果也与之前报道的大规模流行病学得到的两个人群存在着微生物共代谢差异的结果相一致。通过建立拟杆菌属(*Bacteroides spp.*)类群特异性克隆文库,对家庭成员肠道内拟杆菌属的多样性进行分析,结果发现类群特异性文库反映的拟杆菌属的多样性较通用文库高,并发现很多未知的、新的拟杆菌种类^[51]。对肠道内优势细菌、拟杆菌属及柔嫩梭菌亚群的变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析结果显示,该家庭成员的肠道菌群结构存在一定的性别差异,并鉴定出与性别相关的种类,例如 *Bacteroides thetaiotaomicron* 在男性成员中较女性多。利用核磁共振技术(NMR)对尿液代谢物组成的分析发现,该家庭成员的整体代谢特性也存在着性别差异,并鉴定出与性别相关的代谢物,例如3-aminoisobutyrate在男性尿液中较女性多。同时我们也引入了“功能元基因组”的概念,利用多变量统计学方法将反映肠道菌群结构变化的DGGE数据与反映宿主代谢变化的尿液NMR数据加以联系,寻找肠道菌群结构与宿主代谢的共变化(covariation)特征,鉴定出肠道微生物中最能影响宿主代谢及健康的重要功能成员。例如,我们发现一种重要的细菌 *Faecalibacterium prausnitzii* 的变化与8种尿液代谢物相关,提示了这种细菌可能是肠道菌群中一个影响着宿主多个代谢通路的重要功能成员。同时也鉴定出其他与宿主代谢相关的多个功能成员。我们所建立的方法有助于理解宿主与微生物之间共生关系的分子基础,对于研发个性化的药物和膳食干预方案、监控公众的健康状况变化、有效地预防疾病,具有重要的意义。

综上所述,人体肠道内存在的这个几乎是世界上密度最高的微生物群落与人体健康息息相关。肠

道菌群除了可以影响宿主脂肪的代谢和储存,调控宿主能量平衡,更重要的是在宿主慢性炎症的发生中起着不可忽视的中介作用,是膳食结构变化与人的遗传体质的相互作用下导致肥胖及相关的代谢性疾病发生的一个重要环节。对于这个中间环节的深入研究,很有可能使我们对肥胖等代谢性疾病的发生、发展的机理取得全新的认识,进而引起诊断、预测、预警和治疗的根本性变化。

[参 考 文 献]

- [1] Consultation World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic[R]. World Health Organization Technical Report Series, 2000
- [2] Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome—a new worldwide definition. *Lancet*, 2005, 366(9491): 1059–62
- [3] Campbell TC, Campbell TM. The China study: the most comprehensive study of nutrition ever conducted and the startling implications for diet, weight loss and long-term health [M]. Dallas: Benbella Books, 2005
- [4] Heilbronn LK, Campbell LV. Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. *Curr Pharm Des*, 2008, 14(12): 1225–30
- [5] Backhed F, Ding H, Wang T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(44): 15718–23
- [6] Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 2005, 308(5728): 1635–8
- [7] Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 2010, 464(7285): 59–65
- [8] Lederberg J. Infectious history. *Science*, 2000, 288(5464): 287–93
- [9] Roberfroid MB, Bornet F, Bouley C, et al. Colonic microflora: nutrition and health. Summary and conclusions of an International Life Sciences Institute (ILSI) [Europe] workshop held in Barcelona, Spain. *Nutr Rev*, 1995, 53(5): 127–30
- [10] Cummings JH, Beatty ER, Kingman SM, et al. Digestion and physiological properties of resistant starch in the human large bowel. *Br J Nutr*, 1996, 75(5): 733–47
- [11] Crowell MD, Cheskin LJ, Musial F. Prevalence of gastrointestinal symptoms in obese and normal weight binge eaters. *Am J Gastroenterol*, 1994, 89(3): 387–91
- [12] O'Malley KJ, Flechner SM, Kapoor A, et al. Acute colonic pseudo-obstruction (Ogilvie's syndrome) after renal transplantation. *Am J Surg*, 1999, 177(6): 492–6
- [13] Fink H, Rex A, Voits M, et al. Major biological actions of CCK—a critical evaluation of research findings. *Exp Brain Res*, 1998, 123(1–2): 77–83
- [14] Lieveerse RJ, Masclee AA, Jansen JB, et al. Obese women are less sensitive for the satiety effects of bombesin than lean women. *Eur J Clin Nutr*, 1998, 52(3): 207–12

- [15] Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc*, 1980, 55(7): 434-8
- [16] Nosova T, Jokelainen K, Kaihovaara P, et al. Aldehyde dehydrogenase activity and acetate production by aerobic bacteria representing the normal flora of human large intestine. *Alcohol Alcohol*, 1996, 31(6): 555-64
- [17] Cope K, Risby T, Diehl AM. Increased gastrointestinal ethanol production in obese mice: implications for fatty liver disease pathogenesis. *Gastroenterology*, 2000, 119(5): 1340-7
- [18] Nair S, Cope K, Risby TH, et al. Obesity and female gender increase breath ethanol concentration: potential implications for the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol*, 2001, 96(4): 1200-4
- [19] Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 2006, 444(7122): 1027-31
- [20] Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 2006, 444(7122): 1022-3
- [21] Backhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, et al. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(3): 979-84
- [22] Cai D, Yuan M, Frantz DF, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. *Nat Med*, 2005, 11(2): 183-90
- [23] Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 1993, 259(5091): 87-91
- [24] Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol*, 2004, 25(1): 4-7
- [25] Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 2007, 56(7): 1761-72
- [26] Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, et al. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 1990, 249(4975): 1431-3
- [27] Neal MD, Leaphart C, Levy R, et al. Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier. *J Immunol*, 2006, 176(5): 3070-9
- [28] Tomita M, Ohkubo R, Hayashi M. Lipopolysaccharide transport system across colonic epithelial cells in normal and infective rat. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2004, 19(1): 33-40
- [29] Griffiths EA, Duffy LC, Schanbacher FL, et al. *In vivo* effects of bifidobacteria and lactoferrin on gut endotoxin concentration and mucosal immunity in Balb/c mice. *Dig Dis Sci*, 2004, 49(4): 579-89
- [30] Wang Z, Xiao G, Yao Y, et al. The role of bifidobacteria in gut barrier function after thermal injury in rats. *J Trauma*, 2006, 61(3): 650-7
- [31] Kitchens RL, Thompson PA. Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions. *J Endotoxin Res*, 2005, 11(4): 225-9
- [32] Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 2008, 57(6): 1470-81
- [33] Creely SJ, McTernan PG, Kusminski CM, et al. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 292(3): E740-7
- [34] Brun P, Castagliuolo I, Di Leo V, et al. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 292(2): G518-25
- [35] Pappo I, Becovier H, Berry EM, et al. Polymyxin B reduces cecal flora, TNF production and hepatic steatosis during total parenteral nutrition in the rat. *J Surg Res*, 1991, 51(2): 106-12
- [36] Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*, 2007, 50(11): 2374-83
- [37] Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*, 2009, 58(8): 1091-103
- [38] Finegold SM, Attebery HR, Sutter VL. Effect of diet on human fecal flora: comparison of Japanese and American diets. *Am J Clin Nutr*, 1974, 27(12): 1456-69
- [39] Mai V, Katki HA, Harmsen H, et al. Effects of a controlled diet and black tea drinking on the fecal microflora composition and the fecal bile acid profile of human volunteers in a double-blinded randomized feeding study. *J Nutr*, 2004, 134(2): 473-8
- [40] Furrie E. A molecular revolution in the study of intestinal microflora. *Gut*, 2006, 55(2): 141-3
- [41] Zhang M, Liu B, Zhang Y, et al. Structural shifts of mucosa-associated lactobacilli and Clostridium leptum subgroup in patients with ulcerative colitis. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(2): 496-500
- [42] Hayashi H, Sakamoto M, Kitahara M, et al. Molecular analysis of fecal microbiota in elderly individuals using 16S rDNA library and T-RFLP. *Microbiol Immunol*, 2003, 47(8): 557-70
- [43] Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(32): 12115-20
- [44] McKenna P, Hoffmann C, Minkah N, et al. The macaque gut microbiome in health, lentiviral infection, and chronic enterocolitis. *PLoS Pathog*, 2008, 4(2): e20
- [45] Zhang M, Zhang C, Du H, et al. Pattern extraction of structural responses of gut microbiota to rotavirus infection via multivariate statistical analysis of clone library data. *FEMS Microbiol Ecol*, 2009, 70(2): 21-9
- [46] Zhang C, Zhang M, Wang S, et al. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *ISME J*, 2010, 4(2): 232-41
- [47] Loubinoux J, Mory F, Pereira IA, et al. Bacteremia caused

- by a strain of *Desulfovibrio* related to the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis*. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(2): 931-4
- [48] Weglarz L, Dzierzewicz Z, Skop B, et al. *Desulfovibrio desulfuricans* lipopolysaccharides induce endothelial cell IL-6 and IL-8 secretion and E-selectin and VCAM-1 expression. *Cell Mol Biol Lett*, 2003, 8(4): 991-1003
- [49] Beerens H, Romond C. Sulfate-reducing anaerobic bacteria in human feces. *Am J Clin Nutr*, 1977, 30(11): 1770-6
- [50] Li M, Wang B, Zhang M, et al. Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(6): 2117-22
- [51] Li M, Zhou H, Hua W, et al. Molecular diversity of *Bacteroides* spp. in human fecal microbiota as determined by group-specific 16S rRNA gene clone library analysis. *Syst Appl Microbiol*, 2009, 32(3): 193-200