



凝结芽孢杆菌-乳果糖合生元对 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠肠道健康的影响

刘日亮, 乔羽, 黄桂青, 钱薇, 熊佳利, 王新宇, 郑卫江, 姚文*

南京农业大学消化道微生物实验室, 江苏省消化道营养与动物健康重点实验室, 江苏 南京 210095

刘日亮, 乔羽, 黄桂青, 钱薇, 熊佳利, 王新宇, 郑卫江, 姚文. 凝结芽孢杆菌-乳果糖合生元对 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠肠道健康的影响. 微生物学报, 2022, 62(3): 869–881.

Liu Riliang, Qiao Yu, Huang Guiqing, Qian Wei, Xiong Jiali, Wang Xinyu, Zheng Weijiang, Yao Wen. Effect of synbiotic containing *Bacillus coagulans* and lactulose on gut health in mice with DSS-induced ulcerative colitis. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(3): 869–881.

摘 要:【目的】旨在探究凝结芽孢杆菌-乳果糖合生元对葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate, DSS)诱导的溃疡性结肠炎小鼠临床体征、肠道形态和肠道菌群结构的影响。【方法】选取 24 只初始体重为(22.96±1.87) g 的 7 周龄雄性 C57/BL6 小鼠, 随机分为 4 组, 每组 6 只, 即 CON 组、DSS 组(连续 5 d 饮用 2.5% DSS 水)、SYN-P 组(合生元预防组, 造模前 7 d 每日灌胃 1 次合生元)和 SYN-T 组(合生元治疗组, 造模后 7 d 每日灌胃 1 次合生元)。适应期 7 d, 试验期 19 d, 随后实施安乐死采样。【结果】第 10 天 DSS 造模后, 除 CON 组外其余 3 组小鼠体重开始下降, 其中 DSS 组小鼠体重下降速度最快且疾病活动指数(DAI)最高; 第 14 天停止饮用 DSS 后, SYN-P 和 SYN-T 组体重逐渐恢复正常, 而 DSS 组未能恢复。与 CON 组相比, DSS 组小鼠结肠长度显著降低($P<0.05$), 单位体重的肝脏和脾脏重量显著增加($P<0.05$), SYN-T 组小鼠单位体重的肝脏重量显著增加($P<0.05$)。组织形态学分析表明: CON 组结肠绒毛高度显著高于 DSS 和 SYN-P 组($P<0.05$), DSS 组结肠隐窝深度显著高于其他三组($P<0.05$), DSS 组结肠绒毛隐窝比显著低于 SYN-P 和 SYN-T 组($P<0.05$)。盲肠菌群分析表明: 菌群多样性指数显著改变(ACE、Chao1、Shannon 和 Anova, $P<0.05$); 门水平上, 相较于 DSS 组, SYN-P 组 *Desulfobacterota* 和 *Deferribacteres* 相对丰度显著下降($P<0.05$), SYN-T 组 *Deferribacteres* 相对丰度显著下降($P<0.05$); 属水平上, 肠球菌属(*Enterococcus*)等 13 个优势菌属相对丰度发生改变。PICRUST 分析表明: 相较于

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划(202010307025Z)

Supported by the National College Students Research and Training Program (202010307025Z)

*Corresponding author. E-mail: yaowen67jp@njau.edu.cn

Received: 7 January 2021; Revised: 12 January 2021; Published online: 17 January 2022

CON 和 DSS 组, SYN-P 和 SYN-T 组碳水化合物代谢 KEGG 通路显著上调($P<0.05$); 另外果糖和甘露糖代谢等 11 条 3 级代谢通路受到影响。【结论】乳果糖和凝结芽孢杆菌合生元通过预防和治疗两种方式可缓解 DSS 所诱导的溃疡性结肠炎小鼠相关临床症状, 改善肠道组织形态, 减少肠道内引发炎症反应的 *Desulfobacterota* 和脱铁杆菌门(*Deferribacteres*)相对丰度。

关键词: 凝结芽孢杆菌; 乳果糖; DSS; 肠道菌群

Effect of synbiotic containing *Bacillus coagulans* and lactulose on gut health in mice with DSS-induced ulcerative colitis

LIU Riliang, QIAO Yu, HUANG Guiqing, QIAN Wei, XIONG Jiali, WANG Xinyu, ZHENG Weijiang, YAO Wen*

Jiangsu Key Laboratory of Gastrointestinal Nutrition and Animal Health, Laboratory of Gastrointestinal Microbiology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] To investigate the effect of synbiotic containing *Bacillus coagulans* and lactulose on clinical symptoms, intestinal morphology and microbiota in mice with dextran sodium sulfate (DSS)-induced ulcerative colitis. [Methods] A total of 24 7-week-old male C57/BL6 mice with initial body weight of (22.96 ± 1.87) g were randomized into 4 groups (6 in each): control group (CON), DSS group (2.5% DSS in water for 5 days), SYN-P group (gastric gavage of oral synbiotic once a day for 7 days before DSS administration), and SYN-T group (gastric gavage of oral synbiotic once a day for 7 days after DSS administration). After 7-day pre-feeding period and 19-day experimental period, the mice were euthanized and samples were collected. [Results] On the 10th day in the experimental period, except CON group, mice began to lose weight, among which DSS group had the fastest weight loss and the highest disease activity index (DAI). After DSS treatment was terminated (14th day), the body weight of SYN-P and SYN-T groups gradually returned to normal level, while that of DSS group did not. Compared with CON group, DSS group showed decrease in colon length ($P<0.05$) and increase in liver and spleen indexes (liver or spleen weight/body weight) ($P<0.05$), while SYN-T group demonstrated rise of liver index ($P<0.05$). As for the histomorphology, the height of colon villi in CON group was larger than that in DSS and SYN-P groups ($P<0.05$), and colonic crypt depth in DSS group was larger than that in the other three groups ($P<0.05$). The villus height-to-crypt depth ratio in DSS group was significantly smaller than that in SYN-P and SYN-T groups ($P<0.05$). As to the caecal microflora, the diversity indexes (ACE, Chao1, Shannon, and Anova) of microflora changed ($P<0.05$). At the phylum level, the relative abundance of *Desulfobacterota* and *Deferribacteres* in SYN-P group decreased ($P<0.05$) and that of *Deferribacteres* in SYN-T group reduced ($P<0.05$) compared with that in DSS group. At the genus level, the relative abundance of 13 dominant genera such as *Enterococcus* changed. PICRUSt analysis showed that the KEGG pathway of carbohydrate metabolism was up-regulated in SYN-P and SYN-T groups compared with that in CON and DSS groups ($P<0.05$). In addition, 11 pathways at KEGG level 3, including fructose and mannose metabolism, were affected.

[Conclusion] Synbiotic containing *B. coagulans* and lactulose can relieve clinical symptoms in mice with DSS-induced ulcerative colitis, improve the intestinal morphology, and reduce the relative abundance of *Desulfobacterota* and *Deferribacteres* that caused inflammatory response in the intestinal tract through prevention and treatment.

Keywords: *Bacillus coagulans*; lactulose; DSS; intestinal microbiota

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种慢性炎症疾病,临床特征包括肠道黏膜病变和溃疡、结肠变窄、腹泻和大便带血等现象,发病率与复发率极高,严重影响人类和动物的健康^[1-2]。其病因尚未明确,可能涉及心理因素、遗传异质性、免疫反应失调和肠道微生物等多个方面,其中肠道微生态失调被认为可能是发病的潜在机制,主要涉及某些致病菌(如变形杆菌)的升高和益生菌(如乳酸杆菌)的减少等^[3-4]。

因发病机制尚未明确,UC目前治疗策略主要侧重于通过药物预防和恢复由各种诱因引起的肠道过激免疫性反应^[5]。在我国2020年7月1日“禁抗令”这一划时代的法令颁布之前,人们热衷于采取向饲料中添加抗生素来达到预防和治疗动物的UC,然而抗生素在使用过程中导致的细菌耐药性、机体残留和降解困难等一系列负面影响严重威胁了生态安全和人类健康。因此,在高度关注生态化、无害化和零残留的今天,急需寻求一种新型、有效、稳定的抗生素替代物来解决UC这一问题。

益生菌和益生元近年来已被证明可调节肠道微生物组成、促进有益菌的增殖并抑制致病菌的生长,通过改善肠道微生态为UC治疗提供了一种高效且低毒的新策略^[6-7]。凝结芽孢杆菌是一种常用益生菌,其代谢产物主要以L-乳酸为主,能够通过降低胃肠道的pH值和分泌抗菌肽调节肠道菌群结构,进而抑制有害菌的生长,有利于恢复胃肠道的生态平衡^[8]。此外凝结芽孢杆菌菌体的活性抗原能够刺激机体的非特异性免疫反应,从而提高机体免疫力减少炎症反应^[9]。

乳果糖是由一分子半乳糖和一分子果糖组成的功能性寡糖,不能被宿主消化酶降解,在结肠内菌群的作用下降解生成高浓度小分子有机酸和氢气^[10]。研究表明^[11],0.5%乳果糖可选择性地促进双歧杆菌和乳酸杆菌等有益菌的增殖,使其形成优势菌群,而大肠杆菌、沙门氏菌等致病菌很难利用功能性寡糖作为碳源营养物,因此抑制了致病菌的繁殖与代谢,维持了肠道微生态平衡。

合生元是由益生菌(如上述的凝结芽孢杆菌)和益生元(如上述的乳果糖)组合而成的生物制剂,兼具益生菌和益生元的益生效果,且效果往往优于单一使用益生菌或益生元。合生元通过益生元增强益生菌在肠道的附着和繁殖,从而改善动物肠道环境,提高饲料转化率^[12]。因此,本试验旨在探究凝结芽孢杆菌-乳果糖合生元对葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate, DSS)诱导的溃疡性结肠炎小鼠生长性能、肠道形态和肠道菌群结构的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

合生元:本研究配方包含凝结芽孢杆菌(活菌数 1×10^9 CFU/g,由江苏远山生物技术有限公司提供)和乳果糖口服溶液(商品编号Z1080403016,购自江苏先声再康药业有限公司);DSS[相对分子质量为20 000–50 000,购自翌圣生物科技(上海)有限公司];DNA提取试剂盒(QIAGEN, QIAamp® fast DNA stool mini Kit, Cat No. 51614, 德国);灌胃合生元工作液配置:

每日将 1.5 g 菌粉溶解于 4.5 mL PBS 中混匀, 然后将 4.5 mL 菌粉溶液与 1.5 mL 乳果糖溶液 (667 mg/mL) 转移至 15 mL 离心管中混匀, 即为灌胃工作液。

1.2 试验设计

选取 24 只初始体重为 22.96 ± 1.87 g 的 7 周龄雄性 C57/BL6 小鼠, 随机分为 4 组, 每组 6 只, 即 CON 组、DSS 组、SYN-P 组(合生元预防组)和 SYN-T 组(合生元治疗组)(见图 1)。然后置于南京农业大学屏障动物中心[光照周期为 12 h/d; 温度为 (22 ± 2) °C; 相对湿度 $(50 \pm 5)\%$] 饲喂标准日粮, 适应一周后开始试验。试验期共 19 d: DSS 组、SYN-P 组和 SYN-T 组在第 8 天到第 12 天进行 DSS 造模(将 2.5% DSS 溶解于水中供小鼠饮用); SYN-P 组在 DSS 造模前 7 d (即试验第 1–7 d) 每日灌胃 1 次合生元(每只小鼠灌胃 1×10^9 CFU 凝结芽孢杆菌及 100 μ L 乳果糖; 处理小鼠时颠倒混匀工作液, 用移液器转移 400 μ L 工作液至 1.5 mL 离心管中, 用配备灌胃针的注

射器吸取后灌入小鼠胃中), 其余试验日灌胃 PBS; SYN-T 组在 DSS 造模后 7 d (即试验第 13–19 d) 每日灌胃 1 次合生元(同上), 其余试验日灌胃 PBS; CON 组和 DSS 组则于所有试验日灌胃 PBS。

1.3 样品采集

实验结束时, 用二氧化碳法对小鼠实施安乐死, 随后用解剖剪沿腹中线打开腹腔。取大约 2 cm 长的结肠组织冲洗干净并置于 4% 多聚甲醛溶液中固定, 用于后续组织切片观察; 收集盲肠内容物迅速装入 2 mL 灭菌冻存管, -80 °C 保存用于后续微生物相关分析。

1.4 测定指标和方法

1.4.1 生长性能和疾病活动指数 (disease activity index) 评分

根据标准方案^[13](表 1) 每天准确记录小鼠的采食量、体重、直肠出血和大便黏稠度并评分, 将体重、直肠出血和大便黏稠度 3 项得分的总值作为疾病活动指数。对小鼠解剖采样时称量肝脏和脾脏重量, 测量结肠长度。

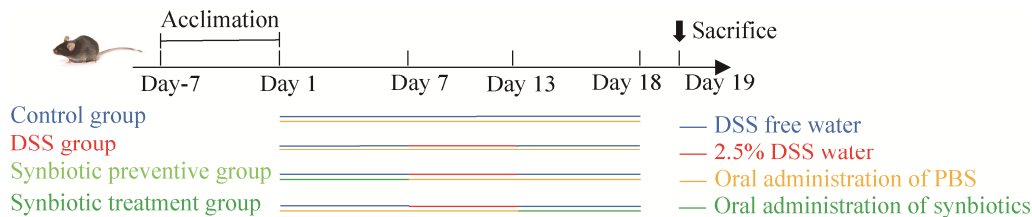


图 1 试验设计

Figure 1 Study design.

表 1 疾病活动指数评分标准

Table 1 Disease activity index (DAI) scoring criteria

Score	Weight loss/%	Rectal bleeding	Stool
0	0	Normal	Normal
1	0.1–5.0	Small amount of blood	Loose normal
2	5.0–10.0	Blood in stool regularly seen	Mild diarrhea
3	>10.0	Blood in all stool	Diarrhea

1.4.2 结肠组织形态学分析

将于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h 的结肠组织取出, 并按照脱水、透明、浸蜡、包埋、切片及染色共 6 个步骤处理^[14]。利用光学显微镜对肠道组织形态进行观察, 随机选取 3–5 个典型视野中共 10 根走向平直的绒毛, 参照刘秋东等^[15]借助 ImageJ 软件测量小肠绒毛长度、隐窝深度, 并计算绒毛高度/隐窝深度比。

1.4.3 肠道菌群分析

取 0.2 g 左右小鼠粪便样品使用 QIAamp DNA Investigator Kit (QIAGEN, Hilden, 德国) 试剂盒并严格按照说明书提取总 DNA, 使用 NanoDrop 超微量分光光度计(Nano-drop-2000, Nano-Drop Technological, 美国)测定浓度与纯度。

利用 PCR 仪(GeneAmp®9700 型, ABI, 美国)扩增小鼠粪样细菌 16S rRNA 基因高变区 V3-V4, 细菌通用引物使用正向引物 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') 和反向引物 806R (5'-GGACTCNGGGTATCTAAT-3')。纯化后的扩增产物在 Illumina MiSeq PE250 平台 (Illumina, San Diego, USA)按照标准操作流程构建 PE 2×300 文库, 依托上海凌恩生物科技有限公司完成。

测序得到的 fastq 文件使用 QIIME (1.17)进行质量过滤, 之后使用 UPARSE 软件包(7.1)在 97%相似水平进行 OTU (operational taxonomic units)聚类分析并且用 UCHIME 删除嵌合序列^[16-17]。原始数据已上传 NCBI (National Center for Biotechnology Information; accession No. SRP344234)。比对数据库 SILVA (SSU132), 使用 RDP (ribosomal database project)算法对 OTU 进行分类, 置信阈值设定为 70%^[18]。为评估各组间微生物多样性的差异, 基于 OTU 相对丰度进行了单样本多样性(α -多样性)和组间多样性(β -多样性)分析。用于可视化不同组别之间数据集交集的 Venn 图通过在线绘制网站绘制 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)。基于 Unweighted Unifrac 算法的非度量多维尺度 (non-metric multidimensional scaling, NMDS)坐标图评估菌群 β -多样性。用于进一步比较分析的种和属水平微生物筛选标准为平均相对丰

度>1%且有效样本数 \geq 80%。

1.4.4 基于 16S rRNA 基因序列的肠道菌群功能预测

基于 OTU 原始丰度表通过生物信息学软件 PICRUST 预测宏基因组功能基因, 将预测基因与 KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes) 数据库比对进行功能注释。

1.5 数据统计和分析

数据通过 Microsoft Excel 初步整理后, 使用 SPSS® Statistics 26.0 统计软件进行 Shapiro-Wilk test 检验其正态性, 然后根据正态分布与否则分别用 One-Way ANOVA 或 Kruskal-Wallis 进行组间差异检验, 利用 Turkey-Kramer test 进行多重比较。数据表现方式为平均值(mean) \pm 标准误差(SEM)。P<0.05 作为差异显著的判断标准。

2 结果与分析

2.1 饲用合生元对 DSS 感染小鼠结肠炎体征的影响

合生元对小鼠结肠炎体征的影响如图 2 所示。由图 2A 所示, 第 10 天起, 除 CON 组, 其余 3 组小鼠体重开始出现下降, 其中 DSS 组下降速度最快; 在第 14 天停止饮用 DSS 后, SYN-P 组和 SYN-T 组均逐渐恢复至正常对照组水平, 而 DSS 组未能恢复。由图 1B 所示, 第 13 天 DSS 组的 DAI 评分最高, 其次是 SYN-T 组, SYN-P 组显著低于 DSS 和 SYN-T 组。由图 C、D 所示, 与 CON 组相比 DSS 组结肠长度明显缩短(P<0.05), 而 SYN-T 组和 SYN-P 组与 CON 组无显著差异(P>0.05)。由图 1E、F 所示, 与 CON 组相比 DSS 组和 SYN-T 组单位体重的肝脏重量显著增加(P<0.05), 且 DSS 组单位体重的脾脏重量显著增加(P<0.05), SYN-P 组肝脏重量和脾脏重量与 CON 组无显著差异(P>0.05)。

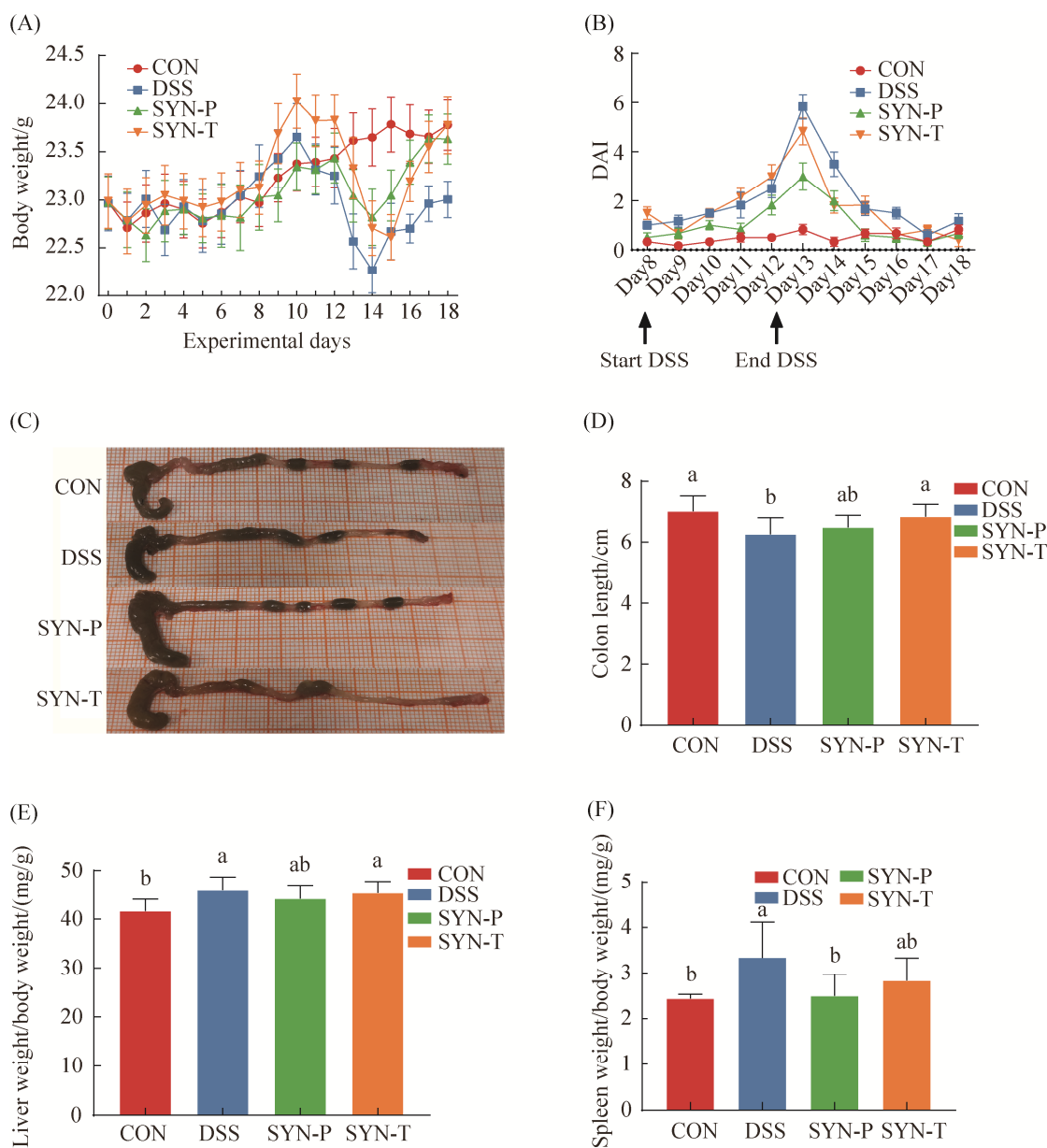


图2 合生元对 DSS 刺激小鼠结肠炎体征的影响

Figure 2 Effects of synbiotic on clinical signs of mice with DSS-induced ulcerative colitis. A: body weight; B: DAI; C, D: the length of the colon; E: liver weight/body weight; F: spleen weight/body weight.

2.2 饲用合生元对 DSS 刺激小鼠结肠组织形态的影响

由表 2 可知, 对照组结肠绒毛高度显著高于 DSS 和 SYN-P 组 ($P < 0.05$), 和 SYN-T 组无差异

($P > 0.05$)。DSS 组结肠隐窝深度显著高于其他 3 组 ($P < 0.05$)。CON 组结肠绒毛高度显著高于其他 3 组 ($P < 0.05$), 且 SYN-P 和 SYN-T 组结肠绒毛高度显著高于 DSS 组 ($P < 0.05$)。

表 2 合生元对 DSS 刺激小鼠结肠组织形态的影响

Table 2 Effects of synbiotic on the colon morphology of mice with DSS

Items	Treatment groups				SEM	P-value
	CON	DSS	SYN-P	SYN-T		
Villus height/ μm	196.78 ^a	162.72 ^b	157.57 ^b	180.42 ^{ab}	5.72	0.050
Crypt depth/ μm	68.35 ^b	81.04 ^a	66.29 ^b	72.53 ^b	2.02	0.037
Villus height/crypt depth	2.87 ^a	2.03 ^c	2.38 ^b	2.49 ^b	0.08	0.000

如图 3 所示, 对照组结肠组织各层清晰可见、黏膜上皮完整且连续、腺体排列整齐、未发生炎症细胞浸润、未见溃疡; DSS 组小鼠结肠组织有肉眼可见的病理损伤、黏膜发生脱落、黏膜层结构明显水肿、黏膜上皮细胞不完整、可看到典型的溃疡等。同 DSS 组相比, SYN-P 和

SYN-T 组的小鼠结肠损伤显著降低, 黏膜组织结构也相对完整, 固有层有少量炎症细胞浸润, 未见溃疡。

2.3 饲用合生元对 DSS 刺激小鼠盲肠微生物多样性的影响

如图 4A 和 B 所示, SYN-T 组丰度指数(ACE

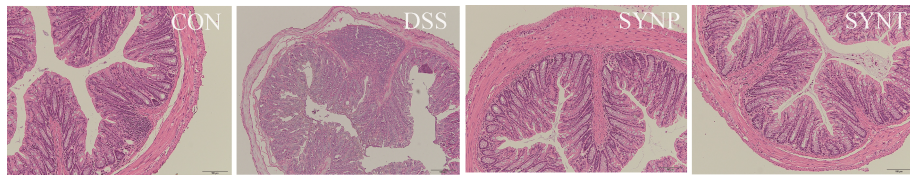


图 3 合生元对 DSS 刺激小鼠结肠组织形态的影响

Figure 3 Effects of synbiotic on the colon morphology of mice with DSS.

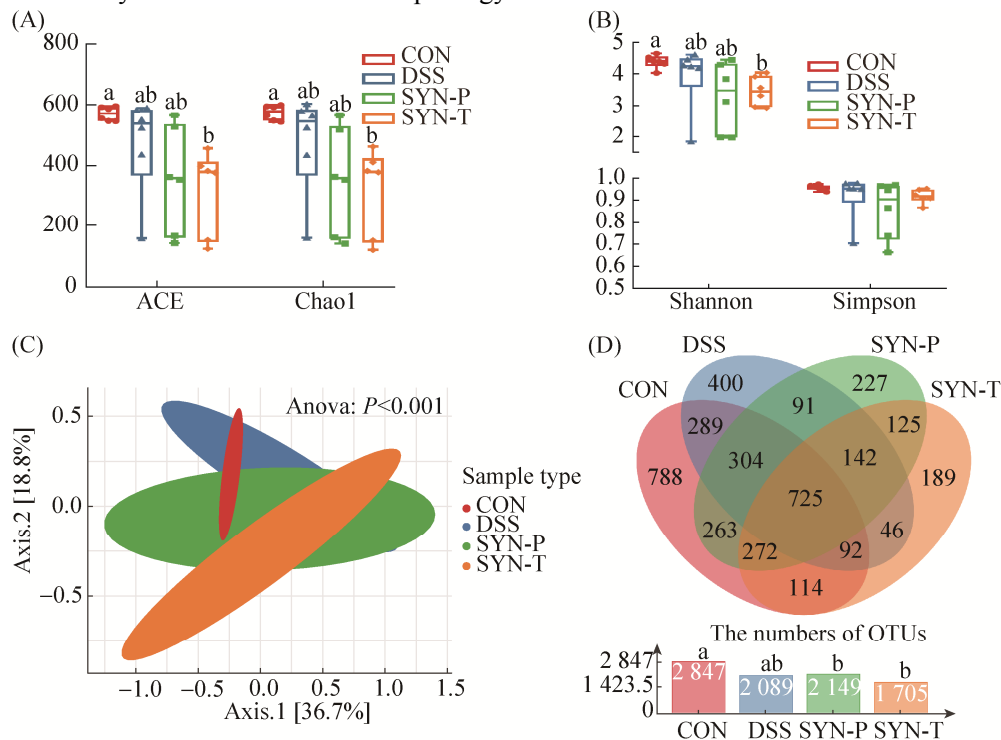


图 4 合生元对 DSS 刺激小鼠盲肠微生物多样性的影响

Figure 4 Effects of synbiotic on the cecal microbial diversity of mice with DSS. A–B: α -diversity; C: β -diversity; D: Venn analysis.

和 Chao1)和多样性指数(Shannon)显著低于 CON 组($P<0.05$), 与其他两组无差异($P>0.05$)。基于 Unweighted Unifrac 距离的 NMDS 分析表明各组微生物区系明显分开(图 4C, $P<0.05$), 其中 CON 组较为集中。韦恩图(图 4D)用于分析各组共有和独有 OTU 数目, CON 组总 OTU 数目显著高于 SYN-P 组和 SYN-T 组($P<0.05$), 其独有 OTU 数目最多, 为 788 个。

2.4 饲用合生元对 DSS 刺激小鼠盲肠菌群结构的影响

合生元对 DSS 刺激小鼠盲肠菌群组成的影响如图 5 所示。在门水平上(图 5A), 优势菌门依次为厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、*Desulfobacterota* 和脱铁杆菌门(*Deferribacteres*), 占小鼠菌群的 99%以上。在属水平上(图 5B), 有 30 个属相对丰度大于 1%为优势菌属。

合生元对 DSS 刺激小鼠盲肠中差异微生物相对丰度的影响如图 6 所示。门水平上, 相较于 DSS 组, SYN-P 组 *Desulfobacterota* 和脱铁杆菌门(*Deferribacteres*)相对丰度显著下降($P<0.05$),

SYN-T 组脱铁杆菌门(*Deferribacteres*)相对丰度显著下降($P<0.05$)。属水平上, 相较于 CON 组, SYN-T 组毛罗杆菌科 NKA136 群(*Lachnospiraceae* NK4A136 group)、毛螺杆菌科未分类(*Lachnospiraceae* uncultured)、嗜木聚糖真杆菌群(*[Eubacterium] xylanophilum* group)、氏菌属(*Roseburia*)和 *Alistipes* 相对丰度显著下降($P<0.05$), SYN-P 组毛螺杆菌科未分类(*Lachnospiraceae* uncultured)、嗜木聚糖真杆菌群(*[Eubacterium] xylanophilum* group)和氏菌属(*Roseburia*)显著下降($P<0.05$), DSS 组嗜木聚糖真杆菌群(*[Eubacterium] xylanophilum* group)、氏菌属(*Roseburia*)显著下降和肠球菌属(*Enterococcus*)显著上升($P<0.05$)。相较于 DSS 组, SYN-T 组嗜性真杆菌群(*[Eubacterium] siraeum* group)、颤螺旋菌科未分类(*Oscillospiraceae* uncultured)、*Odoribacte*、弧菌科未分类(*Desulfovibrionaceae* uncultured)和 *Mucispirillum* 显著下降($P<0.05$), SYN-P 组嗜性真杆菌群(*[Eubacterium] siraeum* group)、*Odoribacte* 和 *Mucispirillum* 显著下降, 另外 SYN-T 组 *Limosilactobacillus* 显著上升($P<0.05$)。

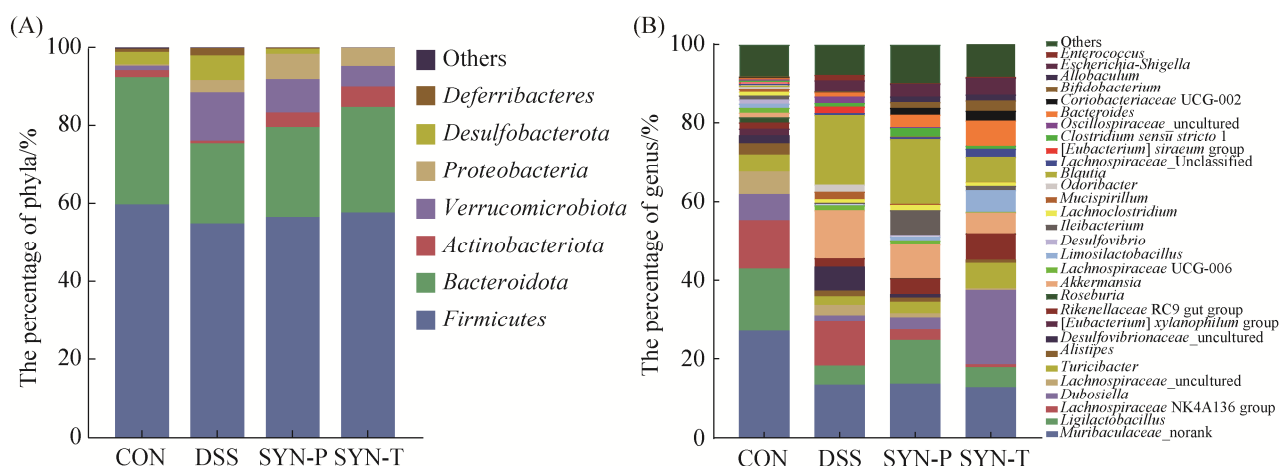


图 5 合生元对 DSS 刺激小鼠盲肠菌群组成的影响

Figure 5 Effects of synbiotic on the cecal microbial composition of mice with DSS. A: phyla levels; B: genus levels; relative abundance >1%.

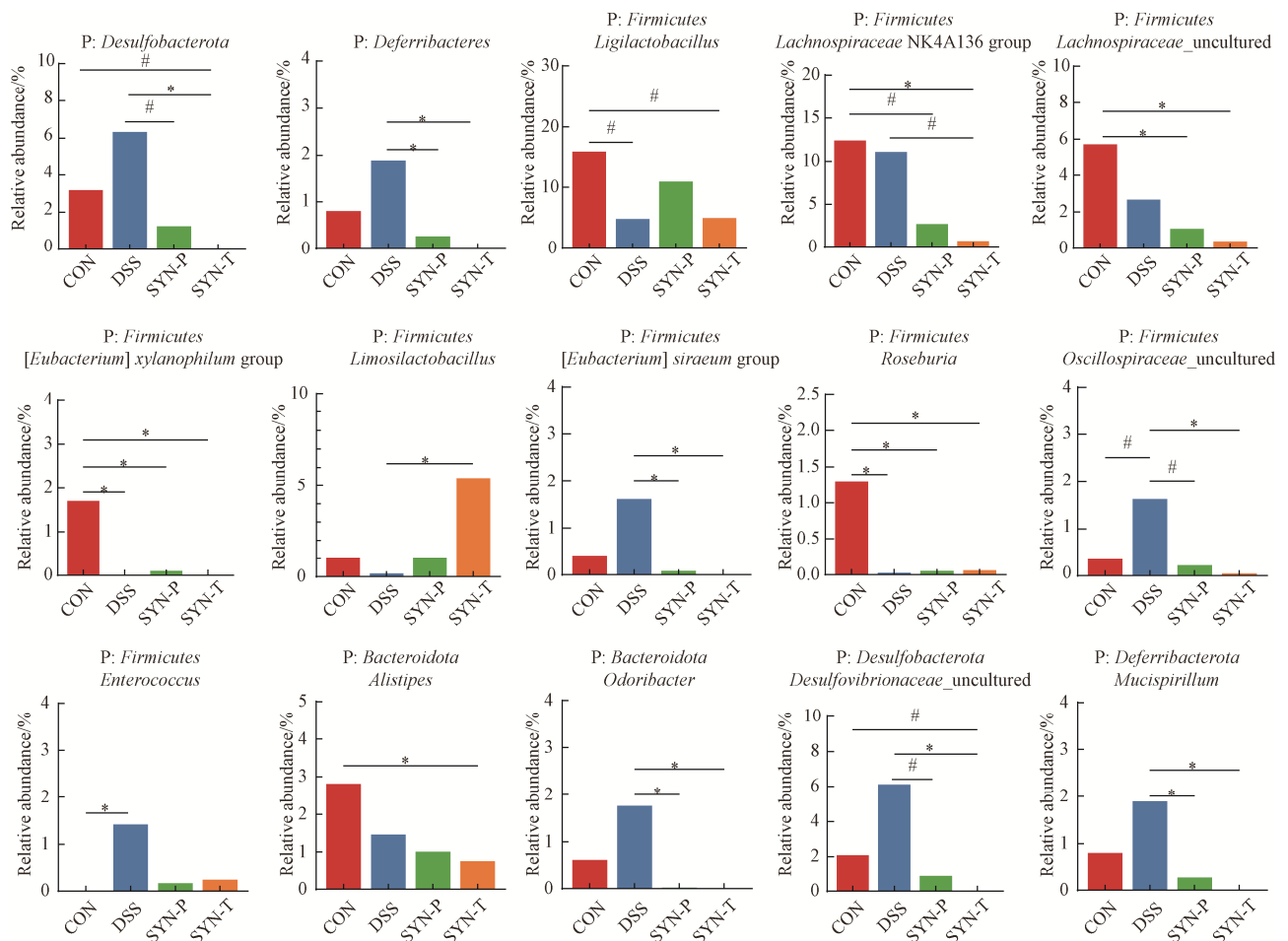


图 6 合生元对 DSS 刺激小鼠盲肠中差异微生物相对丰度的影响

Figure 6 Effects of synbiotic on the relative abundance of cecal difference microbiota of mice with DSS.

2.5 小鼠盲肠微生物功能预测分析

小鼠盲肠菌群 16S rRNA 基因序列的 PICRUSt 分析表明, 合生元显著影响 DSS 刺激小鼠的盲肠菌群功能, 共影响 KEGG 二级代谢通路 4 条和三级代谢通路 11 条(表 3)。在二级代谢通路中, 功能基因主要富集在碳水化合物代谢通路, SYN-P 和 SYN-T 两组的相对丰度显著高于其他两组($P < 0.05$)。三级代谢通路上, 糖酵解与糖原异生、果糖和甘露糖代谢、光合生物的碳固定、磷酸转移酶系统与谷胱甘肽代谢等通路主要在合生元两组富集, 细菌运动蛋白和细菌趋化性等主要富集在 CON 组和 DSS 组, 双组分信号

系统等主要富集在 DSS 组。

3 讨论

UC 作为一种主要的炎症性肠病, 具体发病机制迄今尚未明确。部分研究已表明, 肠道微生物与肠道炎症之间有密不可分的关系, 例如将患有结肠炎小鼠的肠道菌群移植到无菌小鼠中会引起肠道炎症^[19]。所以, 在 UC 的防治中越来越重视肠道菌群的作用, 而由各种原因引起的肠道菌群失调往往是致病菌数量增加而益生菌数量减少。大量文献报道, 在饮食中添加特定益生菌可以调整肠道菌群结构, 竞争性排除病原微生

表 3 合生元对 DSS 刺激小鼠盲肠菌群功能预测 KEGG 通路的影响

Table 3 Effects of synbiotic on the cecal bacterial functional prediction of KEGG metabolic pathways of mice with DSS

KEGG levels	KEGG pathways	Relative abundance/%				SEM	P-value
		CON	DSS	SYN-P	SYN-T		
2	Carbohydrate metabolism	10.52 ^b	10.59 ^b	11.03 ^a	11.25 ^a	0.779	0.005
2	Cell motility	2.42 ^a	2.18 ^a	1.26 ^b	0.97 ^b	0.162	0.007
2	Signal transduction	1.68 ^{ab}	1.84 ^a	1.52 ^{bc}	1.37 ^b	0.049	0.011
2	Environmental adaptation	0.16 ^a	0.17 ^a	0.15 ^b	0.14 ^b	0.002	0.011
3	Glycolysis/gluconeogenesis	1.08 ^c	1.11 ^{bc}	1.16 ^{ab}	1.18 ^a	0.010	0.021
3	Fructose and mannose metabolism	0.98 ^b	0.99 ^b	1.17 ^a	1.24 ^a	0.032	0.022
3	Propanoate metabolism	0.48 ^b	0.49 ^b	0.52 ^b	0.55 ^a	0.007	0.044
3	Bacterial motility proteins	1.05 ^a	0.95 ^a	0.47 ^b	0.32 ^b	0.082	0.012
3	Flagellar assembly	0.53 ^a	0.39 ^{ab}	0.15 ^{bc}	0.08 ^c	0.049	0.021
3	Bacterial chemotaxis	0.49 ^a	0.50 ^a	0.28 ^b	0.21 ^b	0.034	0.035
3	Two-component system	1.53 ^{ab}	1.70 ^a	1.37 ^{bc}	1.22 ^c	0.050	0.020
3	Carbon fixation in photosynthetic organisms	0.61 ^c	0.64 ^{bc}	0.67 ^{ab}	0.69 ^a	0.008	0.023
3	Phosphotransferase system (PTS)	0.49 ^b	0.32 ^c	0.67 ^{ab}	0.90 ^a	0.060	0.018
3	Base excision repair	0.45 ^c	0.46 ^{bc}	0.50 ^{ab}	0.52 ^a	0.007	0.047
3	Glutathione metabolism	0.18 ^b	0.17 ^b	0.18 ^{ab}	0.21 ^a	0.004	0.025

物,从而预防和治疗肠道炎症^[20]。本课题组前期研究发现,在仔猪无抗日粮中添加乳果糖-凝结芽孢杆菌合生元可改善仔猪的生长性能、腹泻率和代谢等^[21-22]。因此,本试验在前期的基础上进一步探讨乳果糖-凝结芽孢杆菌合生元在治疗和预防两种方式上对 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠肠道健康的影响。

本研究中,2 种合生元处理均减轻了由 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠的临床症状,如体重、DAI 指数、结肠长度及肝脏和脾脏重量在一定程度上被改善。其中 DSS 造模后可发现合生元预防组小鼠 DAI 评分低于治疗组小鼠,治疗组小鼠灌胃合生元后 DAI 评分迅速下降,这表明合生元对小鼠健康有实时的积极影响。另外,肠道免疫激活和炎症反应增加与肠道结构受损密切相关^[23]。本试验中组织病理学评分进一步证实上述结果,DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠表现

出结肠损伤且两种合生元处理均在一定程度上缓解该症状。这些结果表明乳果糖-凝结芽孢杆菌合生元通过两种处理均在一定程度上缓解了小鼠的溃疡性结肠炎。

同时,宿主与肠道微生物之间存在动态平衡,结肠组织损伤引起屏障功能丧失往往伴随着肠道菌群的结构改变^[24]。另外,微生物数据库可用性的提高和分子生物学技术的最新发展提高了对微生物群落表征的认识,并揭示了肠道微生态失调与肠道炎症之间的关系^[25]。本研究通过 16S rRNA 基因高通量测序发现,DSS 诱导小鼠产生结肠炎后,灌胃合生元治疗对小鼠盲肠菌群多样性影响更大,包括多样性指数 ACE、Chao1 和 Simpson 和独有 OTU 数目降低。这可能是由于采样前治疗组小鼠仍在灌胃合生元,提示合生元治疗较预防对肠道菌群多样性有更大的动态影响。

虽然小鼠经过两种合生元处理后结肠个别属水平微生物和 KEGG 通路有一定差异,但整体趋势一致,提示合生元对小鼠肠道菌群有一定动态影响。与实验室先前研究结果类似^[26],厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)是小鼠的 2 个主要菌门。本研究中,合生元可显著降低灌胃 DSS 模型小鼠盲肠食糜中 *Desulfobacterota* 和脱铁杆菌门(*Deferribacteres*)相对丰度。Huang 等^[27]研究表明, *Desulfobacterota* 可能释放 LPS 到肠道引起炎症反应,同时扰乱肠道能量代谢。在患有炎症性肠病的小鼠和猪模型中,脱铁杆菌门(*Deferribacteres*)相对丰度显著升高^[28-29];灌胃小鼠益生菌鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*) HDB1258 时,脱铁杆菌门(*Deferribacteres*)相对丰度显著降低^[21]。小鼠盲肠食糜菌群 PICRUSt 功能预测分析得出类似结果,细菌运动性蛋白和鞭毛组装 KEGG 通路主要富集在对照组和 DSS 组,而合生元两组显著改善。细菌运动性蛋白和鞭毛组装通路作为病原菌粘附到绒毛和入侵上皮细胞必不可少的途径,容易导致肠道产生炎症性损伤^[30-31]。属水平分析进一步表明,益生菌 *Limosilactobacillus*^[24]在合生元治疗组显著上升;与炎症呈正相关的肠球菌属(*Enterococcus*)^[32]和 *Mucispirillum*^[33]及可分泌毒素破坏肠黏膜的弧菌科(*Desulfovibrionaceae_uncultured*)^[34]在 DSS 组显著上升,且通过合生元处理可降低这些致病菌的丰度。有趣的是,尽管多数差异菌相对丰度在 DSS 组较高,但碳水化合物代谢 KEGG 通路主要富集在合生元两组,这可能是由于与肠炎相关的致病菌有较低的能量代谢、微生物信号调节和细胞处理途径^[35]。同时,磷酸转移酶系统 KEGG 通路在 DSS 组下调证实了该结果。磷酸转移酶系统主要参与葡萄糖的运输,可运送糖类物质给微生物提供能量进行代谢^[36]。

综上所述,乳果糖和凝结芽孢杆菌合生元

通过预防和治疗两种方式可降低 DSS 所诱导的溃疡性结肠炎小鼠 DAI 指数,增加体重和结肠重量,改善肠道组织形态,减少肠道内引发炎症反应的 *Desulfobacterota* 和脱铁杆菌门(*Deferribacteres*)相对丰度,一定程度上缓解了肠道炎症。

参考文献

- [1] Heredia N, García S. Animals as sources of food-borne pathogens: a review. *Animal Nutrition*, 2018, 4(3): 250–255.
- [2] Danese S, Fiocchi C, Panés J. Drug development in IBD: from novel target identification to early clinical trials. *Gut*, 2016, 65(8): 1233–1239.
- [3] Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. *The Lancet*, 2012, 380(9853): 1606–1619.
- [4] Matijaši M, Meštrovi T, Peri M, Paljetak H, Panek M, Vraneši Bender D, Ljubas Kele D, Krznari Z, Verbanac D. Modulating composition and metabolic activity of the gut microbiota in IBD patients. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(4): 578.
- [5] Tripathi K, Feuerstein JD. New developments in ulcerative colitis: latest evidence on management, treatment, and maintenance. *Drugs in Context*, 2019, 8: 212572.
- [6] Sultan S, El-Mowafy M, Elgaml A, Ahmed TAE, Hassan H, Mottawea W. Metabolic influences of gut microbiota dysbiosis on inflammatory bowel disease. *Frontiers in Physiology*, 2021, 12: 715506.
- [7] Zhang Y, Wu ZJ, Liu JX, Zheng ZM, Li Q, Wang HJ, Chen ZH, Wang KP. Identification of the core active structure of a *Dendrobium officinale* polysaccharide and its protective effect against dextran sulfate sodium-induced colitis via alleviating gut microbiota dysbiosis. *Food Research International*, 2020, 137: 109641.
- [8] Zhou YH, Zeng ZH, Xu YB, Ying JF, Wang BK, Majeed M, Majeed S, Pande A, Li WF. Application of *Bacillus coagulans* in animal husbandry and its underlying mechanisms. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*, 2020, 10(3): 454.
- [9] Bomko TV, Nosalskaya TN, Kabluchko TV, Lisnyak YV, Martynov AV. Immunotropic aspect of the *Bacillus coagulans* probiotic action. *Journal of Pharmacy and*

- Pharmacology*, 2017, 69(8): 1033–1040.
- [10] Ruszkowski J, Witkowski JM. Lactulose: patient- and dose-dependent prebiotic properties in humans. *Anaerobe*, 2019, 59: 100–106.
- [11] Nyangale EP, Farmer S, Keller D, Chernoff D, Gibson GR. Effect of prebiotics on the fecal microbiota of elderly volunteers after dietary supplementation of *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086. *Anaerobe*, 2014, 30: 75–81.
- [12] Sarao LK, Arora M. Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017, 57(2): 344–371.
- [13] Gholamiandehkordi AR, Timbermont L, Lanckriet A, Broeck WVD, Pedersen K, Dewulf J, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R, Immerseel FV. Quantification of gut lesions in a subclinical necrotic enteritis model. *Avian Pathology*, 2007, 36(5): 375–382.
- [14] 魏全伟. 多聚 ADP-核糖聚合酶-1(PARP-1)及其相关信号通路参与猪卵泡发育及闭锁的机制研究. 南京农业大学博士学位论文, 2013.
- [15] 刘秋东, 张中文, 刘凤华, 许剑琴, 云水, 吴国娟. 复方白头翁胶囊对腹泻犬小肠绒毛长度和隐窝深度的影响. 北京农学院学报, 2011, 26(3): 38–40.
Liu QD, Zhang ZW, Liu FH, Xu JQ, Yun S, Wu GJ. Effects of herbal medicine on villus height and crypt depth in small intestine of canine. *Journal of Beijing University of Agriculture*, 2011, 26(3): 38–40. (in Chinese)
- [16] Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996–998.
- [17] Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460–2461.
- [18] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261–5267.
- [19] Eun CS, Mishima Y, Wohlgemuth S, Liu B, Bower M, Carroll IM, Sartor RB. Induction of bacterial antigen-specific colitis by a simplified human microbiota consortium in gnotobiotic interleukin-10-/- mice. *Infection and Immunity*, 2014, 82(6): 2239–2246.
- [20] Marchesi JR, Adams DH, Fava F, Hermes GDA, Hirschfield GM, Hold G, Quraishi MN, Kinross J, Smidt H, Tuohy KM, Thomas LV, Zoetendal EG, Hart A. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut*, 2016, 65(2): 330–339.
- [21] 赵祖艳, 杨运南, 刘日亮, 张云龙, 胡浩, 郑卫江, 姚文. 乳果糖和凝结芽孢杆菌合生素对断奶仔猪生长性能、养分表观消化率和血液指标的影响. 动物营养学报, 2021, 33(7): 3735–3744.
Zhao ZY, Yang YN, Liu RL, Zhang YL, Hu H, Zheng WJ, Yao W. Effects of synbiotic containing lactulose and *Bacillus coagulans* on growth performance, nutrient apparent digestibilities and blood indexes of weaned piglets. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(7): 3735–3744. (in Chinese)
- [22] 杨运南, 赵祖艳, 刘日亮, 张云龙, 胡浩, 郑卫江, 姚文. 金霉素和乳果糖-凝结芽孢杆菌合生素对断奶仔猪相对生长速率和粪便代谢产物的影响. 动物营养学报, 2021, 33(10): 5534–5544.
Yang YN, Zhao ZY, Liu RL, Zhang YL, Hu H, Zheng WJ, Yao W. Effects of chlortetracycline and synbiotic with lactulose and *Bacillus coagulans* on relative growth rate and fecal metabolites of weaned piglets. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(10): 5534–5544. (in Chinese)
- [23] Xu L, Yang ZL, Li P, Zhou YQ. Modulating effect of hesperidin on experimental murine colitis induced by dextran sulfate sodium. *Phytomedicine*, 2009, 16(10): 989–995.
- [24] Ma Y, Hu C, Yan WX, Jiang HM, Liu G. *Lactobacillus pentosus* increases the abundance of *Akkermansia* and affects the serum metabolome to alleviate DSS-induced colitis in a murine model. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2020, 8: 591408.
- [25] Loeffler C, Karlsberg A, Martin LS, Eskin E, Koslicki D, Mangul S. Correction to: improving the usability and comprehensiveness of microbial databases. *BMC Biology*, 2020, 18(1): 92.
- [26] He JW, Liu RL, Zheng WJ, Guo HD, Yang YN, Zhao RQ, Yao W. High ambient temperature exposure during late gestation disrupts glycolipid metabolism and hepatic mitochondrial function tightly related to gut microbial dysbiosis in pregnant mice. *Microbial Biotechnology*, 2021, 14(5): 2116–2129.
- [27] Huang YH, Wang ZJ, Ma HJ, Ji SL, Chen ZP, Cui ZK, Chen JS, Tang SB. Dysbiosis and implication of the gut microbiota in diabetic retinopathy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11: 646348.
- [28] Munyaka PM, Sepehri S, Ghia JE, Khafipour E. Carrageenan gum and adherent invasive *Escherichia coli* in a piglet model of inflammatory bowel disease:

- impact on intestinal mucosa-associated microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 462.
- [29] Han SK, Shin YJ, Lee DY, Kim KM, Yang SJ, Kim DS, Choi JW, Lee S, Kim DH. *Lactobacillus rhamnosus* HDB1258 modulates gut microbiota-mediated immune response in mice with or without lipopolysaccharide-induced systemic inflammation. *BMC Microbiology*, 2021, 21(1): 146.
- [30] Rooks MG, Veiga P, Wardwell-Scott LH, Tickle T, Segata N, Michaud M, Gallini CA, Beal C, Van Hylckama-Vlieg JE, Ballal SA, Morgan XC, Glickman JN, Gevers D, Huttenhower C, Garrett WS. Gut microbiome composition and function in experimental colitis during active disease and treatment-induced remission. *The ISME Journal*, 2014, 8(7): 1403–1417.
- [31] Yang H, Cai R, Kong ZY, Chen Y, Cheng C, Qi SH, Gu B. Teasaponin ameliorates murine colitis by regulating gut microbiota and suppressing the immune system response. *Frontiers in Medicine*, 2020, 7: 584369.
- [32] Zheng JS, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMAP, Harris HMB, Mattarelli P, O'Toole PW, Pot B, Vandamme P, Walter J, Watanabe K, Wuyts S, Felis GE, Gänzle MG, Lebeer S. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70(4): 2782–2858.
- [33] Balish E, Warner T. *Enterococcus faecalis* induces inflammatory bowel disease in interleukin-10 knockout mice. *The American Journal of Pathology*, 2002, 160(6): 2253–2257.
- [34] Loy A, Pfann C, Steinberger M, Hanson B, Herp S, Brugiroux S, Gomes Neto JC, Boekschoten MV, Schwab C, Urich T, Ramer-Tait AE, Rattei T, Stecher B, Berry D. Lifestyle and horizontal gene transfer-mediated evolution of *Mucispirillum schaedleri*, a core member of the murine gut microbiota. *mSystems*, 2017, 2(1): e00171–e00116.
- [35] Sheng LL, Jena PK, Liu HX, Kalanetra KM, Gonzalez FJ, French SW, Krishnan VV, Mills DA, Wan YJY. Gender differences in bile acids and microbiota in relationship with gender dissimilarity in steatosis induced by diet and FXR inactivation. *Scientific Reports*, 2017, 7: 1748.
- [36] Koskenniemi K, Laakso K, Koponen J, Kankainen M, Greco D, Auvinen P, Savijoki K, Nyman TA, Surakka A, Salusjärvi T, De Vos WM, Tynkkynen S, Kalkkinen N, Varmanen P. Proteomics and transcriptomics characterization of bile stress response in probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2011, 10(2): S1–S18.

(本文责编 张晓丽)

姚文，南京农业大学动物科技学院教授、博士生导师、钟山学术骨干，江苏生猪产业技术体系(营养)岗位专家，江苏智慧牧业装备科技创新中心学术委员会副主任。长期从事猪营养生理及减抗福利养殖技术与推广，主持国家和省部级各类科研项目 20 余项。获教育部自然科学(2010 年)、北京市科学技术(2014 年)、江苏省科学技术(2019 年)二等奖各 1 次；授权国家发明专利 6 项；发表论文 130 余篇(其中 SCI 收录论文 50 余篇)。

