



益生菌 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* Zhang 对海南地区部分青年人肠道菌群的影响

沈玲玲, 徐海燕, 侯强川, 赵飞燕, 刘亚华, 王佼, 孙志宏, 张和平*

内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室, 农业农村部奶制品加工重点实验室, 内蒙古自治区乳品生物技术与工程重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010018

摘要:【目的】以海南地区征集的 29 名健康青年志愿者为研究对象, 分析该地区青年人肠道菌群多样性, 并探究益生菌 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* Zhang (LCZ) 对其肠道菌群的影响。【方法】29 名健康青年志愿者每日补充 2 g 益生菌 LCZ (0.5×10^{10} CFU/g), 为期 14 d。采集摄入益生菌 LCZ 第 0、14、28 天的志愿者粪便样品, 采用 PacBio SMRT 测序技术基于 16S rRNA 基因全长测序分析志愿者粪便微生物组成和结构, 评估益生菌 LCZ 对其肠道菌群的影响。【结果】在门水平上, *Firmicutes* (54.46%) 和 *Bacteroidetes* (33.79%) 在志愿者粪便微生物中含量最高; 在属水平上, *Bacteroides* (23.13%) 的相对含量最高; 在种水平上, 优势菌种为 *Faecalibacterium prausnitzii* (9.72%)、*Eubacterium rectale* (7.00%) 和 *Prevotella copri* (6.07%) 等。摄入益生菌 LCZ 14 d 后, 肠道中的优势菌属变化不显著, 低丰度菌属如 *Oscillospira* 和 *Parabacteroides* 等显著增加, *Aeromonas* 和 *Fusicatenibacter* 等显著减少 ($P < 0.05$)。此外根据志愿者粪便中 *Lactobacillus* 含量的变化情况, 将所有志愿者分为两组。其中一组志愿者在摄入 LCZ 后粪便中 *Lactobacillus* 菌属相对含量显著增加, 同时该组志愿者肠道中其他菌种如 *Butyricicoccus pullicaecorum*、*Lactococcus raffinolactis* 和 *Parabacteroides distasoni* 亦显著增加; 而另一组志愿者, *Lactobacillus* 及上述菌种均未发生显著变化。【结论】连续 2 周摄入益生菌 LCZ 对志愿者肠道菌群中优势菌属的相对丰度影响不显著, 但对低丰度菌属的相对丰度影响显著。

关键词: 海南地区青年人群, 肠道菌群, 细菌多样性, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* Zhang

人体肠道中栖息着种类繁多、数量庞大的微生物^[1], 肠道菌群编码的基因组被视为人体的“第二基因组”。近年来研究发现肠道菌群结构受宿主

自身因素和外界环境影响^[2], 其中膳食被认为是影响肠道菌群的重要因素之一, 能够在 24 h 内改变肠道菌群结构^[3], 并且不同的膳食结构会对肠道菌

基金项目: 国家自然科学基金(31720103911); 内蒙古自治区科技重大专项(ZDZX2018018)

*通信作者。Tel: +86-471-4319940; E-mail: hepingdd@vip.sina.com

收稿日期: 2019-09-05; 修回日期: 2020-03-01; 网络出版日期: 2020-03-16

群结构产生不同的影响^[4]。此外,地理环境对肠道菌群的影响同样不容忽视^[5]。海南省地处热带边缘,四面环海,果蔬和水产资源丰富。海南独特的饮食和地理环境,可能使得该地人群的肠道菌群不同于其他地区。因此对该地区青年人肠道菌群多样性进行研究是十分必要的。

目前使用益生菌补充剂来改变肠道菌群进而促进机体健康是一种常见的方法^[6]。*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* Zhang (LCZ)(注:菌株 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* Zhang 于 2002 年时鉴定为 *Lactobacillus casei*, 此后经过重新与 *Lactobacillus casei* 近缘物种进行比对,发现菌株 Zhang 实际菌种信息为 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, 但由于该菌株已在中国普通微生物菌种保藏管理中心备案(CGMCC1679), 并且已经授权了发明专利, 因此, 在本实验室的众多研究中一直沿袭了 *Lactobacillus casei* Zhang 的菌株名, 本研究使用的菌株 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* Zhang 与之前研究中使用的 *Lactobacillus casei* Zhang 为同一株菌, 特此说明。)是分离自内蒙古地区传统发酵酸马奶中 1 株性能优异的益生菌^[7], 具有耐人工胃液^[8]、胆盐消化^[9]、免疫调节^[10]、抗氧化^[11]等益生功能。有研究指出益生菌对不同人群肠道菌群的影响不同, 如 Zhang 等^[12]分析了摄入 LCZ 对内蒙古地区青年人肠道菌群的影响, 发现 LCZ 的摄入显著改变了肠道菌群的组成和多样性。而海南地区青年人所处环境及饮食特点均不同于内蒙古地区, Zhang 等的研究结果并不能完全适用于海南地区人群。PacBio SMRT 测序技术具有高通量、长读取长度及测序时间短等优点, 并能在种水平准确获取样品中的菌群组成^[13-14]。此外有关益生菌对海南地区青年人肠道菌群的影响鲜有报道, 因此

本研究在揭示海南地区青年人肠道菌群的特点上, 进一步探究 LCZ 对该地区青年人肠道菌群的具体影响。

1 材料和方法

1.1 试验设计

本研究从海南地区共征集了 29 名健康志愿者, 其中男性 10 名, 女性 19 名。志愿者年龄为 20-24 岁, BMI 均小于 30 kg/m², 具体信息详见表 1。所有志愿者身体健康, 均没有内分泌失调、糖

表 1. 志愿者信息

Table 1. The information of volunteers

Sample	Gender	Age	Stature/cm	Body weight/kg	BMI
HN1	male	20	171	72	24.62
HN2	male	20	168	65	23.03
HN3	male	21	165	61	22.41
HN4	male	20	170	75	25.95
HN5	male	20	162	65	24.77
HN6	male	21	166	61	22.14
HN7	male	21	170	62	21.45
HN8	male	23	173	83	27.73
HN9	male	21	182	95	28.68
HN10	female	20	161	56	21.60
HN11	female	21	158	52	20.83
HN12	female	20	155	50	20.81
HN13	female	23	161	50	19.29
HN14	female	21	152	48	20.78
HN15	female	21	155	46	19.15
HN16	female	23	155	48	19.98
HN17	female	21	168	49	17.36
HN18	female	21	162	55	20.96
HN19	female	20	160	53	20.70
HN20	female	21	153	45	19.22
HN21	female	21	158	51	20.43
HN22	female	21	160	49	19.14
HN23	female	23	155	46	19.15
HN24	female	24	165	55	20.20
HN25	female	24	159	48	18.99
HN26	female	24	166	51	18.51
HN27	female	24	159	46	18.20
HN28	female	23	161	50	19.29
HN29	male	23	173	83	27.73

尿病或其他任何胃肠道疾病，并且在最近的 6 个月内没有服用过抗生素类药物。所有志愿者均自愿参与本试验，并签署了知情同意书，且本试验申请了内蒙古农业大学伦理审查。在志愿者获得知情同意书后，通过食物调查问卷记录志愿者长期饮食，并参照《食物成分表》^[15]换算成各类营养素的量，详细信息见表 2。所有志愿者保持正常饮食及睡眠，每天午饭后摄入 2 g 益生菌 LCZ (0.5×10^{10} CFU/g)，持续 14 d，采集摄入益生菌 LCZ 第 0、14、28 天 3 个时间点的粪便样品，并在益生菌摄入期间，记录饮酒和服药等特殊情况。

表 2. 饮食调查

Table 2. Dietary questionnaires

Sample	Protein/ (g/day)	Fat/ (g/day)	Carbohydrate/ (g/day)	Dietary fiber/ (g/day)
HN1	54.07	38.24	137.76	23.80
HN2	59.48	37.90	209.85	14.60
HN3	63.09	32.87	187.42	16.44
HN4	56.48	35.55	192.23	23.88
HN5	63.69	32.20	192.23	14.60
HN6	51.81	24.48	234.74	13.65
HN7	61.96	25.42	296.39	21.94
HN8	65.49	33.21	164.99	16.50
HN9	55.28	28.51	187.42	28.70
HN10	79.91	34.55	158.59	38.30
HN11	51.28	23.78	310.62	16.75
HN12	95.35	25.19	296.39	14.60
HN13	75.10	41.59	166.60	14.60
HN14	55.88	35.55	150.58	19.00
HN15	53.62	27.94	159.31	13.97
HN16	77.51	41.26	168.20	18.30
HN17	48.01	30.22	163.39	20.30
HN18	69.70	40.25	203.44	20.05
HN19	54.67	44.61	160.19	22.88
HN20	76.30	43.27	208.25	17.75
HN21	81.04	21.41	251.93	12.41
HN22	76.30	43.27	147.37	23.20
HN23	75.10	29.85	152.18	20.20
HN24	65.88	35.07	142.97	15.56
HN25	60.36	30.13	296.39	21.67
HN26	49.14	29.90	312.99	24.06
HN27	46.47	37.92	136.16	19.45
HN28	63.84	25.37	129.35	17.17
HN29	41.77	25.41	266.04	20.45

1.2 主要试剂与仪器

Sample Protector for RNA/DNA，大连宝生物工程技术有限公司；QIAamp[®]Fast DNA Stool Mini Kit 试剂盒，德国 QIAGEN 公司；KAPA HiFi Hotstart Ready Mix PCR Kit，美国 KAPA 公司；SMRT 建库试剂盒(DNA Template Prep Kit 1.0)、测序试剂(DNA/Polymerase Binding Kit P6 v2)，美国太平洋生物科学公司。PacBio SMRT RS II 测序平台，美国 Pacific Biosciences 公司；Applied Biosystems PCR 仪，美国应用生物系统公司；Qubit 2.0，美国生命技术有限公司。

1.3 样品采集

采集第 0、14、28 天的粪便样品，样品采集均由志愿者个人完成，使用无酶无菌管采集约 15 g 的新鲜粪便样品，加入 DNA 保护液(sample protector of RNA/DNA)后冷冻，并尽快运回实验室。

1.4 粪便细菌宏基因组 DNA 提取

将粪便样品充分混匀后取 0.3 g 备用，依照 QIAamp[®]Fast DNA Stool Mini Kit 试剂盒说明书的步骤提取细菌宏基因组 DNA，用 ND-1000 型微量紫外分光光度计检验 DNA 样品的浓度。

1.5 细菌 16S rRNA 基因全长扩增

使用 16S rRNA 通用引物对所有样品宏基因组 DNA 的 16S rRNA 基因全长进行扩增，扩增引物为 27F(5'-AGAGTTTGATCMTG-GCTCAG-3')和 1492R(5'-ACCTTGTTACGACTT-3')^[16]。因测序时每个文库需要等质量的 12 个样品，所以为了区分同一个文库中的不同样品，用带有识别标签(barcode)的引物对每个样品进行 PCR 扩增，以区分文库中的不同样品，扩增条件参照说明书。PCR 程序设置为：95 °C 3 min；98 °C 20 s，58 °C 45 s，72 °C 1 min，循环 28 次；72 °C 1 min，4 °C 终止。

1.6 文库构建和 PacBio SMRT 三代测序

将每个文库中样品的 PCR 产物纯化后等质量混匀, 依据 SMRT 建库试剂盒的说明书构建文库。将构建好的文库, 加测序试剂后, 使用 PacBio RS II 仪器上机测序。

1.7 高质量序列的提取

使用 RS_ReadsOfinsert.1 对原始序列进行质控, 将符合以下标准的序列保留: (1) 插入片段重复测序的次数 ≥ 5 ; (2) 最小预测精确度为 90%; (3) 最短插入序列长度为 1400 bp; (4) 最长插入序列长度为 1800 bp。

1.8 生物信息学分析和数据处理

根据标记的 Barcode 信息将原始序列划分到每个样品中, 应用 QIIME 平台(v1.70)对高质量的序列进行生物信息学分析。(1) 采用 PYNAST 校准并将序列排齐后在 97% 相似性下进行 UCLUST 归并, 随后按照序列相似性划分操作分类单元 (operational taxonomic units, OTU), 应用 Chimera Slayer 检测嵌合体序列并在 QIIME 平台下去除。(2) 从各 OTU 中选取 1 条代表性序列, 分别使用 RDP (Ribosomal database project)、Greengenes (V13.8) 和 Silva (Livingtree project) 数据库对其进行序列同源性比对, 将 3 个数据库比对结果中最精确的一个, 确定为相应 OTU 的最终注释结果, 然后进行后续分析。基于 OTU table 计算各样品菌群在细菌门、属和种水平的组成。(3) 使用 FastTree (v2.1.3) 软件构建基于 OTU 代表性序列的进化树。随后计算各样品的香农指数 (Shannon index)、超 1 指数 (Chao1 index)、发现物种数 (Observed species index) 和 辛普森指数 (Simpson index), 采用 Mann-whitney U 检验和 Wilcoxon 检验评估各样品

的细菌丰度和多样性。采用 Origin 8.6 软件、GraphPad 7.0 和 R 语言软件(v3.3.2)对 QIIME 产生的结果进行分析和作图。

1.9 核酸序列登录号

本试验所有的测序数据均已上传到 MG-RAST 数据库 (<http://metagenomics.anl.gov/>), 项目号为 mgp90631。

2 结果和分析

2.1 测序深度评估及 α 多样性分析

应用三代测序平台对细菌 16S rRNA 基因序列全长测序, 测序后经过质量控制, 纳入本研究的 87 个样品共获得 541848 条高质量 16S rRNA 基因序列, 平均每个样品的序列数为 6228 条 (范围: 3058–16195, SD=2546)。共划分得到 178130 个 OTUs 进行下一步分析, 平均每个样品 OTU 的数量为 2047 个 (范围: 571–3859, SD=698)。

本研究绘制稀疏曲线和香农曲线用于评估测序量是否满足后续分析 (图 1)。为了尽可能地捕获之前研究中未发现的菌种, 本研究在划分 OTU 时采用无参考数据集 (*de novo*) 的方式进行。包括本研究在内的众多研究均采用该 OTU 划分方式, 其稀疏曲线随着测序量增加均无法达到完全水平状态^[17-18], 但如果香农曲线能够达到水平状态, 则表明测序量已能够捕获样品中绝大多数的菌群组成。图 1 可以看出本研究中稀疏曲线未进入平台期, 但香农曲线已接近平台期, 表明虽然随着测序深度的增加, 有可能发现新的物种, 但当前测序量已覆盖样品中大部分的微生物组成, 可以满足后续分析的需要。

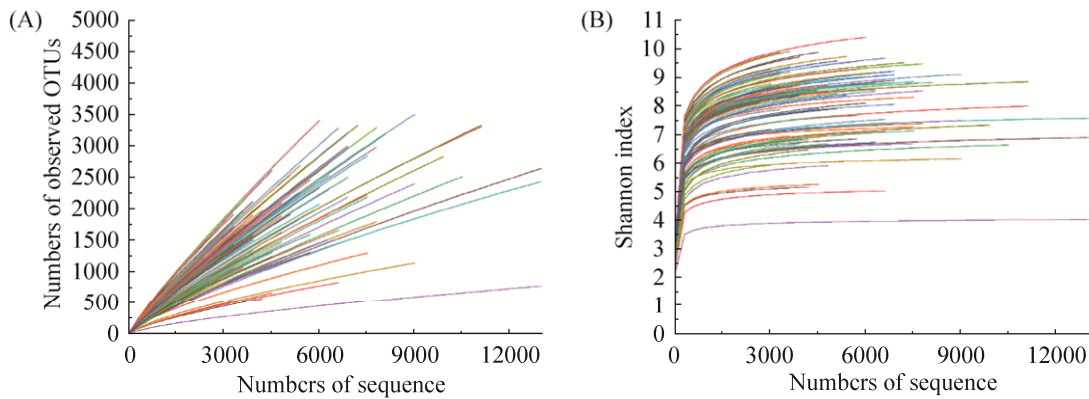


图 1. 稀疏曲线图(A)和香农多样性图(B)

Figure 1. Rarefaction curves (A) and Shannon diversity index (B).

为了评估摄入 LCZ 对志愿者肠道菌群多样性的影响, 分别采用香农指数和辛普森指数评价肠道菌群的多样性, 超 1 指数和发现物种数评价其丰度。通过

Mann-whitney U 检验比较摄入益生菌 LCZ 第 0、14、28 天的 α 多样性指数, 发现摄入 LCZ 没有显著改变志愿者肠道菌群多样性($P>0.05$), 如表 3 所示。

表 3. 样品 α 多样性指数

Table 3. α -diversity in all samples

α -diversity	Day 0	Day 14	Day 28	<i>P</i> -value
Shannon index	7.78±1.22	7.94±1.20	7.56±1.16	0.37
Chao1 index	7715.72±3747.72	7556.72±3431.48	7176.40±2907.06	0.95
Observed species index	1098.74±320.95	1148.26±301.12	1071.16±287.28	0.74
Simpson index	0.96±0.04	0.96±0.05	0.95±0.04	0.22

2.2 志愿者肠道菌群的细菌群落结构分析

为了进一步分析 LCZ 对肠道菌群结构的影响, 本研究基于加权 UniFrac 距离 (weighted UniFrac distances) 采用主成分分析评估志愿者在摄入益生菌 LCZ 前后肠道菌群结构的差异 (图 2), 图中每个点代表每个志愿者摄入 LCZ 不同时期的肠道菌群组成。图中可以看出志愿者第 0、1、28 天的粪便样品存在交叠现象, 无明显的聚类趋势。

2.3 海南地区青年人肠道菌群组成

本研究对第 0 天的肠道菌群数据进行分析, 结果显示在门水平上, *Firmicutes*、*Bacteroidetes*、*Proteobacteria* 和 *Actinobacteria* 是 4 个最主要的细

菌门, 分别占总序列的 54.46%、33.79%、8.04% 和 1.33%。其中 *Firmicutes* 和 *Bacteroidetes* 占绝对

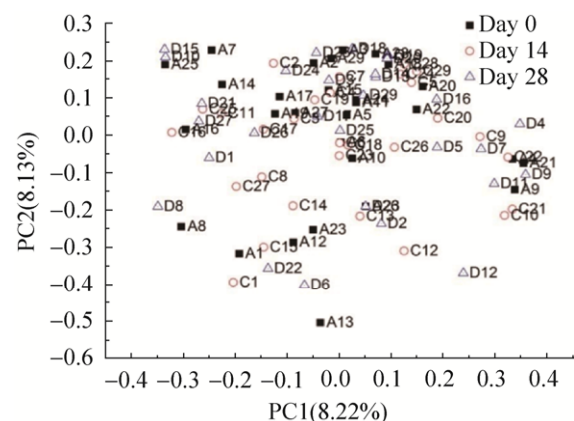


图 2. 志愿者菌群结构的主坐标分析图

Figure 2. The PCA of gut microbiota population structure.

优势, 比例占肠道内总细菌的 85%以上。在属水平上, *Bacteroides* 是相对含量最多的菌属, *Faecalibacterium*、*Eubacterium*、*Clostridium*、*Prevotella*、*Phascolarctobacterium* 和 *Ruminococcus* 等相对含量均大于 1%。在种水平上, *Faecalibacterium prausnitzii* (9.72%)为优势菌种, 它是该地区健康青年人肠道中含量最多的共生厌氧菌。*Eubacterium rectal* (6.98%)、*Prevotella copri* (6.07%)、*Bacteroides plebeius* (4.72%)、*Bacteroides vulgates* (4.27%)等相对含量较高, 如图 3 所示。

2.4 LCZ 对志愿者肠道菌群组成的影响

由前面分析可知海南地区青年人肠道菌群的原始组成及摄入益生菌 LCZ 对志愿者肠道细菌多样性没有显著影响, 在此基础上进一步分析 LCZ 对志愿者肠道细菌组成的影响。首先基于细菌属水平进行分析, 通过 Mann-whitney U 检验发现在摄入 LCZ 期间, 志愿者肠道中优势菌属变化差异不显著。但一些低丰度菌属, 如 *Akkermansia*、*Flavonifractor*、*Howardella*、*Oscillospira* 和 *Parabacteroides* 显著增高($P<0.05$), 而 *Aeromonas* 和 *Fusicatenibacter* 显著下降($P<0.05$), 如表 4 所示。

在细菌种水平, 本研究发​​现志愿者肠道中优势菌种的相对丰度没有发生显著变化, 但是低丰度菌种变化显著。经 mann-whitney U 检验发现, 摄入益生菌 LCZ 后志愿者肠道中的 *Alistipes indistinctus*、*Flavonifractor plautii*、*Lactobacillus casei*、*Lactobacillus prepcasei*、*Parabacteroides distasonis* 和 *Parabacteroides johnsonii* 的相对含量显著增加, *Fusicatenibacter saccharivorans* 的相对含量显著降低($P<0.01$), 具体变化如表 5 所示。而在 6 名志愿者

的原始肠道菌群中检测到 *Lactobacillus paracasei*, 其相对含量在 0.001%–0.01%。将原始志愿者肠道中 *Lactobacillus paracasei* 的序列和 LCZ 的序列进行比对, 发现它们的序列并不一致, 而将摄入 LCZ 后检测到的 *Lactobacillus paracasei* 的序列与 LCZ 的序列进行比对, 发现肠道中检测到的 *Lactobacillus paracasei* 的 89%序列与 LCZ 的序列相同, 在停止摄入 LCZ 后, 仍可检测到与 LCZ 完全一致的序列, 表明 LCZ 在志愿者的肠道中可以存活 2 周以上。

2.5 LCZ 对志愿者肠道中 *Lactobacillus* 的影响

Lactobacillus 是人体中常见的有益菌之一, 本研究进一步分析了试验期间志愿者肠道中 *Lactobacillus* 相对丰度的变化。志愿者在摄入益生菌 LCZ 后, 其肠道中 *Lactobacillus* 的变化趋势并不相同。在摄入 LCZ 后, 15 名志愿者肠道中 *Lactobacillus* 的含量显著增加, 5 名志愿者肠道中 *Lactobacillus* 的含量显著减少, 其余 9 名志愿者肠道中 *Lactobacillus* 的含量没有变化, 如图 4 所示。

根据上述结果, 将 *Lactobacillus* 含量增加的 15 名将志愿者归为 A 组, 剩余志愿者(包括 5 名 *Lactobacillus* 含量下降和 9 名没有变化的志愿者)归为 B 组。经 mann-whitney U 检验发现 A 组志愿者肠道中 *Butyricoccus pullicaecorum*、*Lactobacillus casei*、*Lactobacillus prepcasei*、*Lactococcus raffinolactis* 和 *Parabacteroides distasonis* 的丰度显著增加(表 6), 而在 B 组中没有发现类似的变化($P<0.05$), B 组中 *Clostridium disporicum* 和 *Fusicatenibacter saccharivorans* 的丰度显著减少(表 7)。通过对摄入 LCZ 14 d 时两组数据分析发现, A 组志愿者肠道中 *Lactobacillus casei* 和 *Lactobacillus prepcasei* 的含量更高(表 8)。

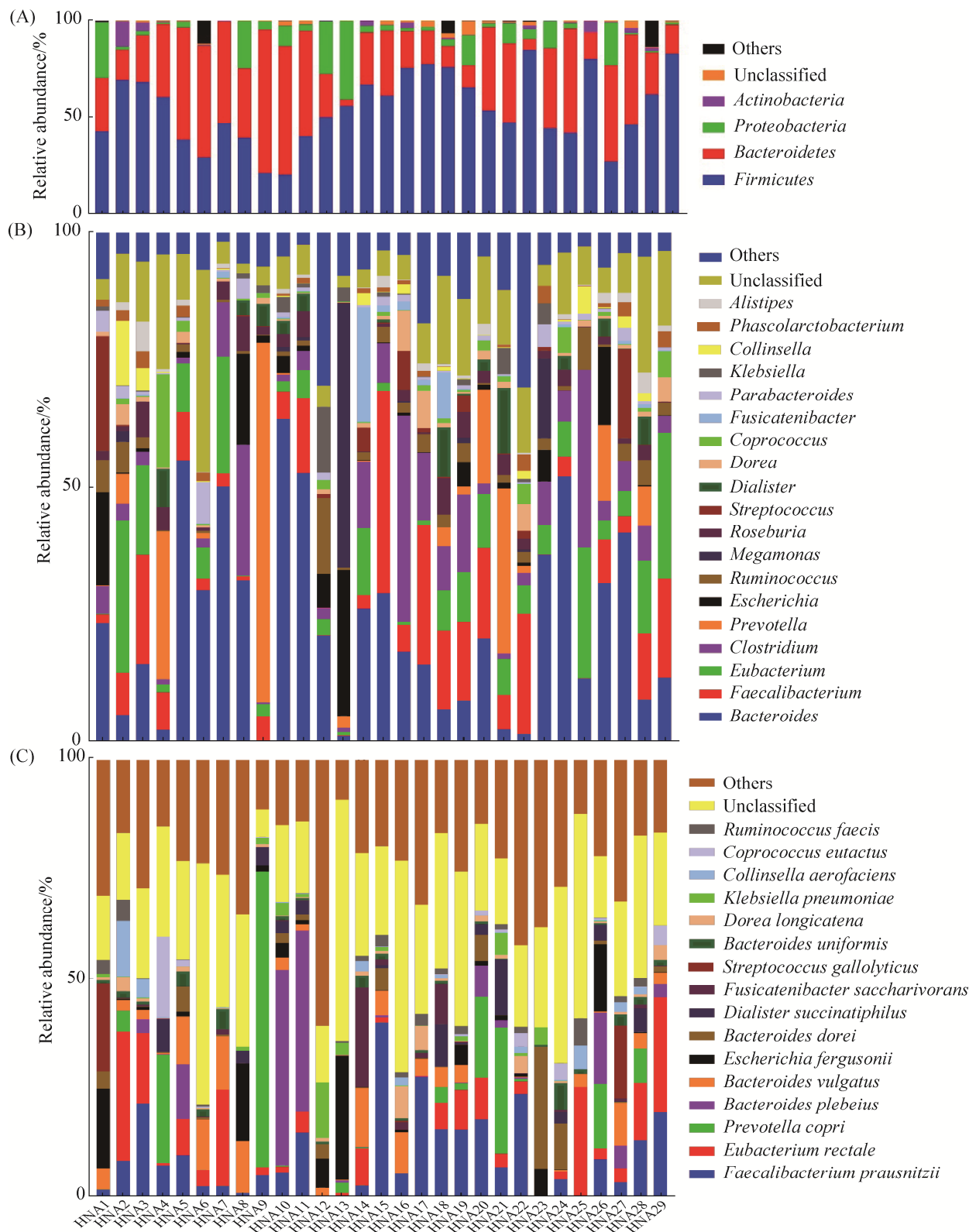


图 3. 志愿者肠道菌群组成

Figure 3. The gut bacterial composition of volunteers. A: Phylum; B: Genus; C: Species.

表 4. 摄入益生菌前后志愿者肠道中细菌属变化

Table 4. Changes in the genus in the volunteers' intestines after supplement probiotic

Genus	Relative contribution/%			P-value		
	Day 14	Day 28	Day 28	Day 0	Day 14	Day 0
	VS 0	VS 14	VS 0	VS 14	VS 28	VS 28
<i>Aeromonas</i>	↓	↑	↓	0.04	0.18	0.40
<i>Akkermansia</i>	↑	↓	↑	0.12	0.88	0.03
<i>Flavonifractor</i>	↑	↓	↓	0.05	0.17	0.27
<i>Fusicatenibacter</i>	↓	↑	↓	0.01	0.27	0.20
<i>Howardella</i>	↑	↓	↑	0.04	0.12	0.72
<i>Oscillospira</i>	↑	↓	↑	0.01	0.41	0.02
<i>Parabacteroides</i>	↑	↓	↑	0.04	0.73	0.97

表 5. 摄入益生菌前后志愿者肠道中细菌种比较分析

Table 5. Comparison of species in the intestines of the volunteers after supplement probiotic

Species	Relative contribution/%			P-value		
	Day 14	Day 28	Day 28	Day 0	Day 14	Day 0
	VS 0	VS 14	VS 0	VS 14	VS 28	VS 28
<i>Akkermansia muciniphila</i>	↑	↓	↑	0.12	0.88	0.03
<i>Alistipes indistinctus</i>	↑	↓	↓	0.02	0.09	0.47
<i>Flavonifractor plautii</i>	↑	↓	↓	0.05	0.17	0.27
<i>Fusicatenibacter saccharivorans</i>	↓	↑	↓	0.01	0.27	0.20
<i>Lactobacillus casei</i>	↑	↓	↑	0.01	0.05	0.68
<i>Lactobacillus prepcasei</i>	↑	↓	↑	0.01	0.04	0.67
<i>Parabacteroides distasonis</i>	↑	↓	↓	0.01	0.38	0.93
<i>Parabacteroides johnsonii</i>	↑	↓	↑	0.01	0.33	0.05

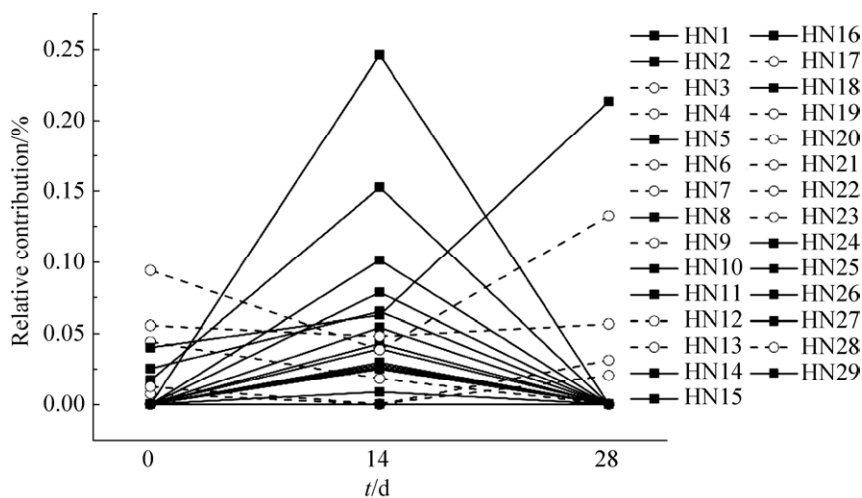


图 4. *Lactobacillus* 的变化

Figure 4. Changes in the *Lactobacillus*.

表 6. A 组志愿者肠道中细菌种比较分析

Table 6. comparison of species in the intestines of group A volunteers

Species	Relative contribution/%		P-value
	Day 0	Day 14	
<i>Alistipes onderdonkii</i>	0.02	0.07	0.028
<i>Bacteroides plebeius</i>	8.39	2.54	0.050
<i>Blautia faecis</i>	0.06	0.02	0.028
<i>Butyrivibrio pullicaecorum</i>	0.00	0.02	0.028
<i>Curvibacter lanceolatus</i>	0.03	0.00	0.038
<i>Lactobacillus casei</i>	0.01	0.06	0.001
<i>Lactobacillus prepcasei</i>	0.01	0.07	0.001
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	0.00	0.01	0.043
<i>Parabacteroides distasonis</i>	0.87	1.28	0.048
<i>Weissella confusa</i>	0.08	0.00	0.043

表 7. B 组志愿者肠道中细菌种比较分析

Table 7. Comparison of species in the intestines of group B volunteers

Species	Relative contribution/%		P-value
	Day 0	Day 14	
<i>Clostridium disporicum</i>	0.04	0.01	0.036
<i>Fusicatenibacter saccharivorans</i>	1.42	0.17	0.009
<i>Paraprevotella clara</i>	0.05	0.13	0.028
<i>Parasutterella excrementihominis</i>	0.18	0.41	0.013
<i>Roseburia hominis</i>	0.11	0.43	0.041
<i>Ruminococcus torques</i>	0.08	0.12	0.025
<i>Streptococcus vestibularis</i>	0.01	0.00	0.043
<i>Thermus scotoductus</i>	0.01	0.00	0.028

表 8. A 组和 B 组摄入 LCZ14 d 志愿者肠道中细菌种比较分析

Table 8. Comparison of species in the intestines of volunteers between group A and B during taking LCZ for 14 days

Species	Relative contribution/%		P-value
	A group	B group	
<i>Alistipes shahii</i>	0.1	0.16	0.036
<i>Bacteroides salyersiae</i>	0.07	0.14	0.019
<i>Lactobacillus casei</i>	0.06	0.04	0.001
<i>Lactobacillus prepcasei</i>	0.07	0.01	0.001
<i>Paraprevotella clara</i>	0.07	0.13	0.03
<i>Phascolarctobacterium succinatutens</i>	0	0.37	0.014

2.6 菌群关联性分析

本研究进一步利用 Spearman 相关性检验分析了摄入益生菌 LCZ 后肠道菌群之间的相互关系，图中红线代表正相关，蓝线代表负相关，结果显示 *Lactobacillus casei* 与 *Parabacteroides distasonis*、*Phascolarctobacterium faecium* 和 *Eubacterium rectale* 呈显著正相关，如图 5 所示。

3 讨论

影响肠道菌群组成的因素有很多，如饮食、宿主遗传、疾病药物和环境等，有关研究表明人类肠道微生物群主要受饮食、生活方式和环境的影响^[19]。在本研究中，为将饮食、生活方式和环境等因素对粪便微生物群的影响最小化，参与本试验的志愿者均来自海南大学，身体健康，且他们的年龄、日常活动和生活方式都相似^[20]。本研究发现该地区健康青年人肠道菌群主要由 *Firmicutes* 和 *Bacteroidetes* 中的细菌属组成^[21]，这也与之前的多数研究结果相一致^[22-23]。优势菌属为 *Bacteroides*、*Faecalibacterium*、*Eubacterium*、*Prevotella* 和 *Ruminococcus* 等，其中 *Bacteroides* 占绝对优势^[23]。而 Zhang 等^[21]对中国内蒙古、新疆、云南和广西等地健康成年人肠道菌群的研究发现 *Phascolarctobacterium*、*Roseburia*、*Prevotella*、*Bacteroides* 和 *Blautia* 等是优势菌属，这表明海南地区青年人的肠道菌群不同于其他地区。*Faecalibacterium prausnitzii* 一般在健康人体肠道中的相对含量超过细菌总数的 5%^[24]，在本研究中它是该地区健康青年人肠道中最丰富的细菌，其含量达到 9.72%。它能够为肠上皮细胞提供能量，

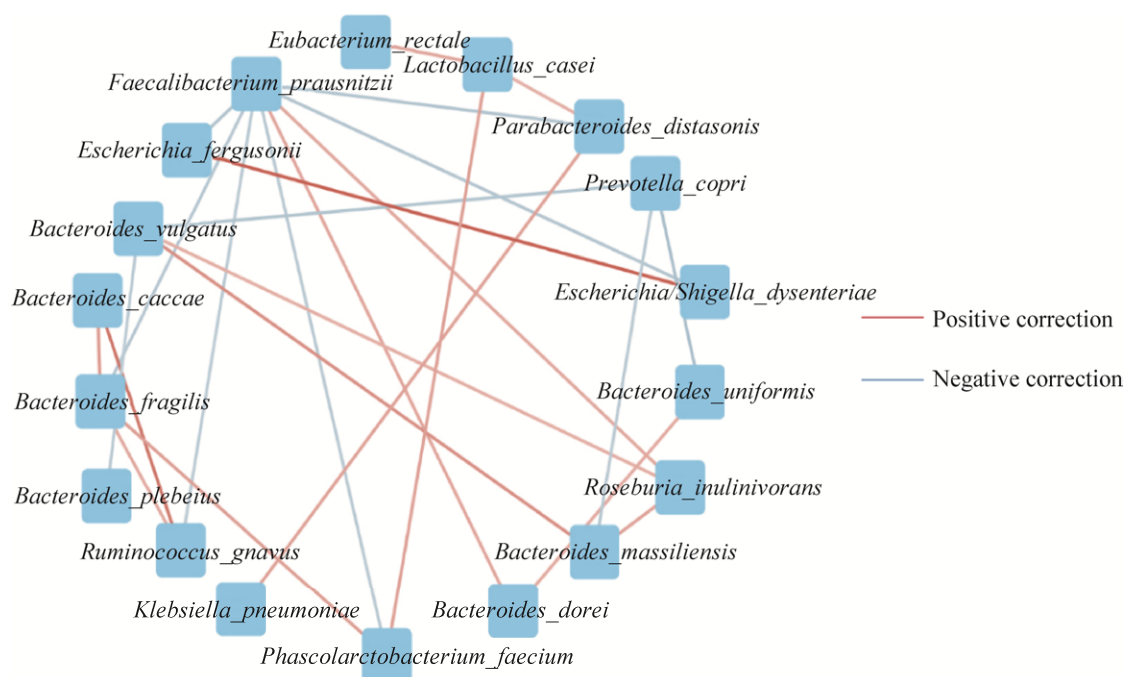


图 5. 摄入益生菌 LCZ 14 d 志愿者肠道菌群之间的相关性

Figure 5. The correlation of intestinal flora bacterial species level during taking LCZ for 14 days.

并影响宿主的多个代谢通路；它也是产丁酸盐最丰富的细菌之一^[25]，通过在肠道中产生丁酸盐，从而影响宿主生理功能和维持宿主健康稳态^[26]。它的相对含量较高可能与该地的环境和饮食密切相关。首先海南地处热带边缘，富含纤维素的果蔬种类繁多。其次据饮食调查表显示，志愿者每天至少食用 14 g 纤维，有的志愿者可以达到 24 g/d。Shen 等^[27]研究表明纤维摄入量与 *Faecalibacterium prausnitzii* 在肠道中的含量显著相关，这也证明了上述观点。*Faecalibacterium prausnitzii* 被认为是成年人肠道健康的指标和参与者^[28]，可以将其作为该地区肠道健康的标志物之一。

一个健康的肠道菌群具有一定的自我调节能力，面对内外的压力时(例如饮食、药物、年龄等因素)，肠道菌群恢复到原有状态是健康肠道菌群潜在的特征之一^[29]。本研究中摄入益生菌 LCZ 后

α 多样性没有显著变化也验证了该结论。虽然摄入益生菌 LCZ 期间优势菌属菌种的变化差异小，但低丰度菌属菌种变化显著。在细菌属水平，本研究发志愿者肠道中 *Aeromonas* 的相对含量显著下降，而 *Akkermansia*、*Oscillospira* 和 *Parabacteroides* 的相对含量显著增加。Janda 等^[30]研究表明 *Aeromonas* 是引起免疫功能低下者和免疫功能不全者各种感染并发症的病原。*Akkermansia* 在为宿主提供能量的同时还可以调控脂质代谢、糖代谢和免疫反应等生物学过程以促进人体健康^[31]。Konikoff 等^[32]研究发现 *Oscillospira* 虽然仍无法培养，但基于测序技术使得它在肠道中经常被发现，且它和人体的健康密切相关，其含量减少可能会导致肥胖或炎症的发生。在种水平上，志愿者肠道中 *Alistipes indistinctus*、*Parabacteroides distasonis* 和 *Parabacteroides johnsonii* 等菌种的含量显著增加，*Fusicatenibacter saccharivorans* 等显

著降低。*Parabacteroides distasonis* 是一种很有前途的益生菌，可以调节宿主的代谢，减轻肥胖和代谢功能障碍，其含量与肥胖、非酒精性脂肪肝、糖尿病等疾病状态呈显著负相关^[33]，在本研究中发现 LCZ 摄入后，志愿者肠道中 *Parabacteroides distasonis* 的含量显著增加，说明服用 LCZ 可能对人体健康有益。这些结果均表明摄入益生菌 LCZ 可以增加该地区青年人肠道中有益菌的含量，降低有害菌的含量。

此外，通过摄入益生菌 LCZ 后志愿者肠道中 *Lactobacillus* 的变化，本研究发现了不一样的结果。按照 *Lactobacillus* 的变化，可以将他们分为两组，摄入菌粉后含量增加的志愿者为一组(A 组)，其余志愿者为一组(B 组)。A 组志愿者肠道中 *Butyricoccus pullicaecorum*、*Lactobacillus casei*、*Lactococcus raffinolactis* 和 *Parabacteroides distasoni* 显著增加，而在 B 组中没有发现类似的变化。这表明 LCZ 对每个志愿者肠道菌群的影响是不同的，其原因可能是个体肠道菌群的特异性，导致其对 LCZ 的应答不同^[8]；且益生菌的定植模式高度依赖个体情况，可能其中一些志愿者的肠道接受了 LCZ 的定殖，从而对人体产生有益的影响。菌群关联性分析也发现 *Lactobacillus casei* 与 *Parabacteroides distasonis*、*Phascolarctobacterium faecium* 和 *Eubacterium rectale* 呈显著正相关。此外从 *Lactobacillus* 的含量变化发现，A 组志愿者在摄入菌粉期间，肠道中 *Lactobacillus paracasei* 的含量显著增加，但在停止摄入菌粉 14 d，其含量又几乎恢复到原有水平，说明益生菌的补充可能需要一个持续的过程^[2]。

4 结论

本研究发现，海南地区健康青年人的肠道微

生物主要由 *Firmicutes* 和 *Bacteroidetes* 中的细菌属组成，*Faecalibacterium Prausnitzii* 在其肠道中的相对含量最高。摄入 2 周的益生菌 LCZ 对健康志愿者粪便微生物多样性的影响不显著，但可以增加肠道中的低丰度有益菌，如 *Oscillospira*、*Parabacteroides* 和 *Akkermansia* 等。在 LCZ 摄入后粪便中 *Lactobacillus* 菌属相对含量显著增加的志愿者，其肠道中其他菌种如 *Butyricoccus pullicaecorum*、*Lactococcus raffinolactis* 和 *Parabacteroides distasoni* 亦显著增加，而 *Lactobacillus* 变化不显著的志愿者，其肠道中没有发现类似的变化。

参考文献

- [1] Tremaroli V, Backhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, 2012, 71(7415): 242–249.
- [2] Khalesi S, Bellissimo N, Vandelanotte C, Williams S, Stanley D, Irwin C. A review of probiotic supplementation in healthy adults: helpful or hype? *European Journal of Clinical Nutrition*, 2018, 73(1): 24–37.
- [3] Aguirre M, Eck A, Koenen ME, Savelkoul PHM, Budding AE, Venema K. Diet drives quick changes in the metabolic activity and composition of human gut microbiota in a validated *in vitro* gut model. *Research in Microbiology*, 2016, 167(2): 114–125.
- [4] Liu WJ, Zhang JC, Wu CY, Cai SF, Hang WQ, Chen J, Xi XX, Liang ZB, Hou QC, Zhou B, Qin N, Zhang HP. Unique features of ethnic mongolian gut microbiome revealed by metagenomic analysis. *Scientific Reports*, 2016, 6: 34826.
- [5] He Y, Wu W, Zheng HM, Li P, McDonald D, Sheng HF, Chen MX, Chen ZH, Ji GY, Zheng ZDX, Mujagond P, Chen XJ, Rong ZH, Chen P, Lyu LY, Wang X, Wu CB, Yu N, Xu YJ, Yin J, Raes J, Knight R, Ma WJ, Zhou HW. Regional variation limits applications of healthy gut microbiome reference ranges and disease models. *Nature Medicine*, 2018, 24(10): 1532–1535.

- [6] Kristensen NB, Bryrup T, Allin KH, Nielsen T, Hansen TH, Pedersen O. Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: a systematic review of randomized controlled trials. *Genome Medicine*, 2016, 8(1): 52.
- [7] Wu RN, Wang LP, Wang JC, Li HP, Menghe B, Wu JR, Guo MR, Zhang HP. Isolation and preliminary probiotic selection of *Lactobacilli* from koumiss in Inner Mongolia. *Journal of Basic Microbiology*, 2010, 49(3): 318–326.
- [8] Wu RN, Wang WW, Yu DL, Zhang WY, Li Y, Sun ZH, Wu JR, Meng H, Zhang HP. Proteomics analysis of *Lactobacillus casei* Zhang, a new probiotic bacterium isolated from traditional home-made koumiss in Inner Mongolia of China. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2009, 8(10): 2321–2338.
- [9] Wu R, Sun Z, Wu J, Meng H, Zhang H. Effect of bile salts stress on protein synthesis of *Lactobacillus casei* Zhang revealed by 2-dimensional gel electrophoresis. *Journal of Dairy Science*, 2010, 93(8): 3858–3868.
- [10] Ya T, Zhang QJ, Chu FL, Merritt J, Bilige MH, Sun TS, Du RT, Zhang HP. Immunological evaluation of *Lactobacillus casei* Zhang: a newly isolated strain from koumiss in Inner Mongolia, China. *BMC Immunology*, 2008, 9(1): 68.
- [11] Zhang Y, Du RT, Wang LF, Zhang HP. The antioxidative effects of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang on the hyperlipidemic rats. *European Food Research and Technology*, 2010, 231(1): 151–158.
- [12] Zhang JC, Wang LF, Guo Z, Sun ZH, Gesudu Q, Kwok L, Menghebilige, Zhang HP. 454 pyrosequencing reveals changes in the faecal microbiota of adults consuming *Lactobacillus casei* Zhang. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 88(3): 612–622.
- [13] Cao CX, Han W, Zhang HP. Application of third generation sequencing technology to microbial research. *Microbiology China*, 2016, 43(10): 2269–2276. (in Chinese)
曹晨霞, 韩琬, 张和平. 第三代测序技术在微生物研究中的应用. *微生物学通报*, 2016, 43(10): 2269–2276.
- [14] Mosher JJ, Bowman B, Bernberg EL, Shevchenko O, Kan JJ, Korlach J, Kaplan LA. Improved performance of the PacBio SMRT technology for 16S rDNA sequencing. *Journal of Microbiological Methods*, 2014, 104: 59–60.
- [15] Yang YX, Wang GY. China of food composition 2002. Peking University Medical Press, 2002. (in Chinese)
杨月欣, 王光亚. 中国食物成分表 2002. 北京大学医学出版社, 2002.
- [16] Mosher JJ, Bernberg EL, Shevchenko O, Kan JJ, Kaplan LA. Efficacy of a 3rd generation high-throughput sequencing platform for analyses of 16S rRNA genes from environmental samples. *Journal of Microbiological Methods*, 2013, 95(2): 175–181.
- [17] Xu HY, Ma HM, Wang YJ, Zhao FY, Liu YH, Hai T, Zhang HP, Sun ZH. The study on intestinal bacterial diversity in obese individuals. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2018, 18(1): 1–11. (in Chinese)
徐海燕, 马慧敏, 王彦杰, 赵飞燕, 刘亚华, 海棠, 张和平, 孙志宏. 肥胖人群肠道细菌多样性研究. *中国食品学报*, 2018, 18(1): 1–11.
- [18] 薛正晟. 以健康人和大熊猫为模型的哺乳动物肠道菌群多样性分布与核心功能种属的研究. 上海交通大学博士学位论文, 2015.
- [19] Schnorr SL, Candela M, Rampelli S, Centanni M, Consolandi C, Basaglia G, Turroni S, Biagi E, Peano C, Severgnini M, Fiori J, Gotti R, De Bellis G, Luiselli D, Brigidi P, Mabulla A, Marlowe F, Henry AG, Crittenden AN. Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nature Communications*, 2014, 5: 3654.
- [20] Noh CK, Kim BS, Hong G, Cheong JY, Lee KJ. Effects of the Administration of probiotics on fecal microbiota diversity and composition in healthy individuals. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 2018, 24(3): 452–459.
- [21] Zhang JC, Guo Z, Xue ZS, Sun ZH, Zhang MH, Wang LF, Wang GY, Wang F, Xu J, Cao HF, Xu HY, Lv Q, Zhong Z, Chen YF, Qimuge SD, Menghe BLG, Zheng Y, Zhao LP, Chen W, Zhang HP. A phylo-functional core of gut microbiota in healthy young Chinese cohorts across lifestyles, geography and ethnicities. *The ISME Journal*, 2015, 9(9): 1979–1990.
- [22] Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L,

- Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin JJ, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Doré J, MetaHIT Consortium (additional members), Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 2011, 473(7346): 174–180.
- [23] Deschasaux M, Bouter KE, Prodan A, Levin E, Groen AK, Herrema H, Tremaroli V, Bakker GJ, Attaye I, Pinto-Sietsma SJ, van Raalte DH, Snijder MB, Nicolaou M, Peters R, Zwinderman AH, Bäckhed F, Nieuwdorp M. Depicting the composition of gut microbiota in a population with varied ethnic origins but shared geography. *Nature Medicine*, 2018, 24(10): 1526–1531.
- [24] Miquel S, Martín R, Bridonneau C, Robert V, Sokol H, Bermudez-Humaran LG, Thomas M, Langella P. Ecology and metabolism of the beneficial intestinal commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii*. *Gut Microbes*, 2014, 5(2): 146–151.
- [25] Flint HJ, Scott KP, Duncan SH, Louis P, Forano E. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut microbes*, 2012, 3(4): 289–306.
- [26] Macfarlane GT, Macfarlane S. Fermentation in the human large intestine: its physiologic consequences and the potential contribution of prebiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 2011, 45 Suppl: S120–S127.
- [27] Shen Q, Zhao L, Tuohy KM. High-level dietary fibre up-regulates colonic fermentation and relative abundance of saccharolytic bacteria within the human faecal microbiota in vitro. *European Journal of Nutrition*, 2012, 51(6): 693–705.
- [28] Miquel S, Martín R, Rossi O, Bermúdez-Humarán LG, Chatel JM, Sokol H, Thomas M, Wells JM, Langella P. *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Current Opinion in Microbiology*, 2013, 16(3): 255–261.
- [29] Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome Medicine*, 2016, 8(1): 51.
- [30] Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 2010, 23(1): 35–73.
- [31] Zhao F, Li CB. Characteristics of intestinal bacterium *Akkermansia muciniphila* and the association with host health. *Microbiology China*, 2017, 44(6): 1458–1463. (in Chinese) 赵凡, 李春保. 肠道菌 *Akkermansia muciniphila* 的特性及其与机体健康的关系. *微生物学通报*, 2017, 44(6): 1458–1463.
- [32] Konikoff T, Gophna U. *Oscillospira*: a central, enigmatic component of the human gut microbiota. *Trends in Microbiology*, 2016, 24(7): 523–524.
- [33] Wang K, Liao MF, Zhou N, Bao L, Ma K, Zheng ZY, Wang YJ, Liu C, Wang WZ, Wang J, Liu SJ, Liu HW. *Parabacteroides distasonis* alleviates obesity and metabolic dysfunctions via production of succinate and secondary bile acids. *Cell Reports*, 2019, 26(1): 222–235.e5.

Effect of probiotics *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* Zhang on gut microbiota composition of young people living in Hainan

Lingling Shen, Haiyan Xu, Qiangchuan Hou, Feiyan Zhao, Yahua Liu, Jiao Wang, Zhihong Sun, Heping Zhang*

Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture, Inner Mongolia Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Abstract: [Objective] Twenty-nine healthy young volunteers from Hainan were selected as the research objects to analyze the diversity of gut microbes and to explore the effects of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* Zhang on the fecal microbiota. [Methods] Volunteers were supplemented with 1×10^{10} CFU LCZ powders per day for 14 days. Fecal samples were collected on 0, 14 and 28 days. Microbial composition and structure of fecal were analyzed by PacBio SMRT. [Results] *Firmicutes* and *Bacteroidetes* were the most abundant phylum. Meanwhile, *Bacteroides* were the predominant genus. At the species level, the dominant bacteria species were *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale* and *Prevotella copri*. After taking LCZ for 14 days, the dominant bacteria did not change significantly, while low-abundance bacteria such as *Oscillospira* and *Parabacteroides* were significantly increased ($P < 0.05$). In addition, volunteers were divided into two groups according to the changes of *Lactobacillus*. *Butyricoccus pullicaecorum*, *Lactococcus raffinolactis* and *Parabacteroides distasoni* were significantly increased in samples of those with significantly increased content of *Lactobacillus*. Inversely, volunteers with no significant changes in the *Lactobacillus* content in their gut did not find similar changes. [Conclusion] Continuous consumption of probiotics LCZ for 2 weeks had no significant effect on the relative abundance of dominant bacteria in fecal microbiota of volunteers, while the low-abundance bacteria change significantly.

Keywords: Young people in Hainan province, gut microbiota, bacterial diversity, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* Zhang

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31720103911) and by the Inner Mongolia Autonomous Region Major Science and Technology Project (ZDZX2018018)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-471-4319940; E-mail: hepingdd@vip.sina.com

Received: 5 September 2019; Revised: 1 March 2020; Published online: 16 March 2020