

从单菌株组学到宏基因组学: *Lactobacillus casei* Zhang 益生功能

张勇

北京科技大学生物与农业研究中心, 北京 100024

E-mail: zhy-545@163.com

2018-08-28 收稿, 2018-10-20 修回, 2018-10-23 接受, 2018-11-26 网络版发表

摘要 干酪乳杆菌Zhang(*Lactobacillus casei* Zhang, LCZ)是一株研究充分的益生菌, 受传统蒙医学的启发, 分离筛选自内蒙古牧民的自然发酵酸马奶。其研究经历了3个主要阶段, 单菌株组学体外评价阶段, 肠道优势菌结合益生功能体内评价阶段, 益生功能评价与肠道菌群组学结合的阶段。LCZ经过耐酸耐胆盐筛选, 具有较好的体外黏附特性和体外调节巨噬细胞活性的作用。接着进行了菌株全基因组的测定和解析, 抗生素抗性实验显示其具有较强的基因组稳定性。生长过程、酸应激和胆盐胁迫的蛋白组学鉴定出一系列与益生菌生长和抗性相关的功能蛋白。进一步体内试验表明, LCZ已经被证明具有调节肠道菌群的丰度和比例、抗脂质过氧化和增加抗氧化酶活性、调节细胞和体液免疫以及肿瘤免疫功能、改善血脂和肝脏脂质代谢、缓解口服糖耐量受损和预防二型糖尿病、保护肝脏和预防肝损伤、抑制肝移植瘤生长和诱导结肠癌发生发展等多项功能。小规模人群试验表明, LCZ可以维持肠道菌群的丰富度, 增加有益菌的丰度和减少潜在有害菌的丰度。更重要的是, 通过调节肠道菌群预防上呼吸道感染和改善部分衰老指标的功能在中等规模人体随机临床试验中也得到了验证。益生菌LCZ未来将在改善肠道菌群方面发挥更大的益处, 具有开发为预防和辅助改善疾病的保健食品/特医食品的潜能。

关键词 *Lactobacillus casei* Zhang, 益生作用, 组学

人体肠道内存在一个极其复杂的微生物系统, 它能够保持动态平衡并与宿主一起共同进化。许多人体疾病会导致肠道菌群的失衡。肠道菌群参与了宿主的营养、免疫、代谢甚至神经发育等多个过程, 认为是宿主的第二套基因组^[1]。益生菌作为肠道菌群中的一员, 被证明具有调节肠道菌群结构的功能。干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)是益生菌的一个重要的来源分支。干酪乳杆菌在人体的多个部位如胃肠道、皮肤和生殖道等都有定殖^[2,3]。国际上著名的干酪乳杆菌益生菌包括*Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus casei* L26, *Lactobacillus casei* DN-114 001和*Lactobacillus casei* CRL 431等。目前干酪乳杆菌的益

生作用研究主要集中在改善脂质代谢、调节免疫和抑制癌症等方面^[4-6]。本文就来自中国的一株益生干酪乳杆菌LCZ的益生功能以及研究历程做总结。

1 LCZ单菌株组学体外评价阶段

1.1 LCZ的分离背景与鉴定

酸马奶(Koumiss)是马奶经过发酵制成的一种功能饮料, 据《蒙古秘史》等史料记载, 千百年来在北方游牧民族中酸马奶不仅是食物, 而且成为一种独特的传统医疗饮品。蒙古族营养学家忽思慧所著的《饮膳正要》认为, 酸马奶不仅能够止渴, 还能用于

引用格式: 张勇. 从单菌株组学到宏基因组学: *Lactobacillus casei* Zhang 益生功能. 科学通报, 2019, 64: 307-314

Zhang Y. Probiotic effects of *Lactobacillus casei* Zhang: From single strain omics to metagenomics (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 307-314, doi: 10.1360/N972018-00591

治疗发烧. 马可波罗的著作记录了在古老蒙医疗法中, 酸马奶用于治疗肺结核^[7]. 酸马奶除了其自身的蛋白等营养物质外, 其野生发酵菌种在其功能性作用中起到了重要的作用. 酸马奶微生物组成分析显示, 酸马奶中微生物以多种乳杆菌和酵母菌为优势菌, 功能性的成分与微生物存在密切的相关性^[8-10]. 所以发掘古老的微生物资源成为探索酸马奶功效的重要来源. 2002年从内蒙古锡林郭勒草原牧民自然发酵的43份酸马奶样本中分离的240株乳杆菌筛选得到LCZ^[11]. 经16S rDNA同源性比对分析, 与参考菌株*L. casei* ATCC334 的同源性为100%.

益生菌达到足够量才能发挥益生作用, 所以活着到达肠道之前菌株要经受住胃肠道黏液的消化, 最核心的是极酸性的胃液(pH 2.0~3.0)和肠道中的高浓度胆盐^[12]. LCZ具有较好的体外耐酸耐胆盐特性和黏附特性. LCZ经过人工模拟胃液消化3 h加人工肠液(pH 8.0)消化24 h后存活率为73.5%, 以及胆盐耐受性最高浓度为1.6 g/100 mL, 对Caco-2细胞的黏附率为4.31%. 这些指标与其他商业化的知名益生菌嗜酸乳杆菌NCFM(*Lactobacillus acidophilus* NCFM)、鼠李糖乳杆菌GG(*L. rhamnosus* GG)、干酪乳杆菌代田株(*L. casei* Shirota)和动物双歧杆菌Bb12(*Bifidobacterium animalis* Bb12)处于同一水平^[13]. 另外的研究显示标准菌*L. casei* ATCC 334属于胆盐敏感菌株^[14], 所以LCZ的胆盐耐受性远远强于同源性100%的菌株*L. casei* ATCC 334.

1.2 LCZ的基因组与蛋白组

2006年, 本课题组开始使用鸟枪法对LCZ进行全基因组测序. 在2008年5月18日完成组装和分析工作, 并上传到Genbank(accession number CP001084), 成为我国第一个测定完成的乳酸菌全基因组. LCZ基因组由染色体DNA(长度为2861849 bp)和质粒(36 kb)组成, 共包含2804个编码序列(CDSs). 其最具特征的是编码31个磷酸转移酶系统(PTS), 拥有较强的糖利用能力. 质粒中存在一个*relBE*毒素-抗毒素系统, 是其耐受不良营养环境的一个重要因素^[15].

在完成全基因组测序之后, 接着对LCZ的不同生长期蛋白组学进行了差异蛋白解析. 菌株生长对数期和稳定期得到差异化蛋白表达点43个. 主要归于压力胁迫蛋白、中枢代谢、中间代谢的关键分子三类物质. 这项研究为益生菌的研究提供了标准蛋白

表达谱, 通过组学新角度研究益生菌的生长规律^[16].

从蛋白质组学角度出发, 进一步研究了胃酸环境和胆盐环境下对菌株LCZ蛋白表达的影响. 碳水化合物代谢过程相关基因(*NagA*, *NagB*, *PGM*, *GlmM*, *LacC*, *TDP*, *GALM*和*PtsI*)是耐酸条件下表达最具有显著差异的基因. 人工模拟胃酸环境下, 常见耐受性基因*DnaK*发生上调, 新发现了*NagA*, *NagB*, *Galm*和*EstC*一系列乳酸菌的耐酸基因^[17]. 胆盐应激条件下, 菌体细胞保护基因(*DnaK*和*GroEL*)、细胞膜变化基因(*NagA*, *GalU*和*PyrD*)以及中心代谢过程相关基因(*PFK*, *PGM*, *CysK*, *LuxS*, *PepC*和*EF-Tu*)得到显著上调^[18]. 其中常见的耐受基因*NagA*和*NagB*与其他益生菌的研究不尽相同. 益生菌*L. rhamnosus* GG中*NagB*也是耐胆盐基因, *NagA*的作用恰好相反^[19]. 另一株益生菌*L. casei* BL23的耐酸耐胆盐的蛋白组学研究显示, 它的耐受性基因与LCZ相同的极少, 表明作用机制存在较大差异^[20]. 而这些基因需要进一步的研究, 为我们确定益生菌耐受性的核心机理.

1.3 抗生素抗性

抗生素抗性是益生菌发挥益生作用之前不可缺少安全性评价指标. 近年来临床上超级细菌的感染病例数不胜数, 使得几乎所有抗生素全部失效, 严重威胁着人类健康. 乳酸菌作为人类体内常驻的共生细菌, 抗生素使用情况下也会发生潜在的耐药性风险. 我们从基因组学角度入手, 使得LCZ在含有阿莫西林或庆大霉素的培养基中传菌2000代, 模拟微生物在长期抗生素作用下的适应性进化过程, 对不同代数LCZ进行基因组重测序. 比对结果显示, LCZ在适应过程中基因组突变频率增加4倍, 即 3.5×10^{-9} 碱基⁻¹·代⁻¹, 突变频率的增幅显著低于埃希氏大肠杆菌. 从头突变的发生频率, 在长期抗生素暴露下基本不变. 相对适应性达到最大值后, 新型突变的积累随即停止. 而且这期间的突变均未发生在基因组转座区域或者质粒中^[21]. 这些结果提示, 益生菌LCZ在将近10个月的抗生素适应进化过程中具有较高的基因组稳定性, 不会出现与致病菌类似基因组突变频率很高的情况, 不会发展成耐药性极强的超级细菌.

进一步蛋白组学的机理研究显示, 碳水化合物代谢、氨基酸、嘌呤代谢途径及应激反应相关蛋白在LCZ适应庆大霉素的过程中起着主要的作用^[22]. 其中碱性休克蛋白asp23的差异表达决定了LCZ对庆大

霉素适应性,该基因突变体对庆大霉素的敏感性高于野生型菌株。下一步研究还需要从体内揭示益生菌LCZ对庆大霉素的耐药性变化作用。

2 肠道优势菌结合益生功能体内评价阶段

2.1 免疫活性

肠道菌群是宿主免疫的塑造者,70%以上的免疫细胞分布在肠道上皮黏膜。体外研究显示,LCZ活菌与肠道巨噬细胞RAW264.7共培养后,可以上调巨噬细胞的NO、诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、白介素6(IL-6)和干扰素(IFN- β)分泌水平,具有调节细胞免疫的作用。LCZ活菌通过增加干扰素调节因子3(IRF-3)活性可以缓解聚肌苷酸:多胞苷酸诱导巨噬细胞抗炎因子IFN- β 的减少^[23]。LCZ对免疫的调节功能在体内也得到了验证。LCZ活菌干预可以增加健康小鼠BALB/c小鼠多种免疫因子的分泌,显著上调血清IFN- γ 和下调TNF- α 水平,对炎症具有抵抗作用。而热灭活LCZ无此作用。LCZ干预还可以让健康小鼠的血清IgG水平上调3倍和促进肠道内容物sIgA的产生。另一项独立的研究表明,LCZ对健康小鼠的细胞因子IL-2和IL-2受体表达水平显著上调^[24],表明LCZ可以活化CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞,并可促进B细胞增殖,调控细胞免疫应答。

LCZ干预对免疫的调节能力还体现在改善肿瘤免疫功能方面。一项研究结果表明,LCZ活菌对肝癌细胞H22移植性肿瘤的生长具有显著的抑制作用^[25],抑瘤率为40.22%。它能激活小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬活性,促进小鼠脾内T淋巴细胞分泌肿瘤坏死因子 β (TNF- β),同时下调肿瘤组织*Bcl-2*表达和上调*Bax*表达,促进肿瘤细胞的凋亡过程。

2.2 抗氧化作用

氧化性应激在高脂诱发的多种疾病中发挥促进作用,活性氧簇(ROS)的累积可以诱导DNA、蛋白和脂质结构受损。进行抗氧化物干预可以预防活性氧簇引起的多重损伤,预防炎症和疾病的发生。我们的研究发现,LCZ显著降低脂质过氧化物MDA水平,增加抗氧化物酶SOD和GSH-Px的活性。同时肝损伤指标GPT和GOT活性显著降低,总抗氧化能力T-AOC得到显著提高,具有保护肝脏的作用^[26]。这项结果表明,LCZ可以缓解高脂诱导的氧化性应激,降低高

脂膳食大鼠血液和肝脏的脂质过氧化指标。

2.3 改善脂质代谢

益生菌不仅可以降低宿主的脂质过氧化作用,还改善脂质代谢。LCZ可以降低高脂膳食大鼠血清和肝脏总甘油三酯(TG)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平^[27,28]。通过芯片测定肝脏全基因表达图谱,LCZ影响了肝脏中*Acs11*, *Hadh*, *Acaa2*, *Acads*和*gcdH*等一系列脂肪酸的 β 氧化相关基因^[28],进而得出LCZ可以促进脂肪酸的 β 氧化进程,催化辅酶A(CoA)合成和脱氢的关键步骤。

2.4 肝脏保护作用

肝脏是人体主要的解毒和代谢器官,肠肝轴是联系最为紧密的一条轴线。在肠道屏障受损的情况下,肠道细菌产生的内毒素脂多糖(LPS)会经过肠道到达肝脏引起内毒素血症和脓毒症。LCZ可以增加LPS结合半乳糖苷诱导的急性肝损伤大鼠的存活率。同时LCZ显著降低了肝损伤指标谷丙转氨酶和谷草转氨酶的活性^[29]。其机制可能是通过抗氧化和抗炎两个方面实现的。LCZ可以提高抗氧化酶SOD的活力的同时降低脂质过氧化物MDA的水平。LCZ还可以下调LPS的受体TLR4的表达进而降低炎症信号通路NF- κ B和I- κ B的磷酸化。

2.5 糖耐量受损和糖尿病

肥胖会导致血糖紊乱,最终形成高血糖、高血脂甚至伴随高血压的代谢综合征。在代谢综合征发生前期,胰岛素抵抗诱导的糖耐量受损是前期血糖紊乱的主要特征。一项研究结果发现,益生菌LCZ可以明显减少高果糖膳食大鼠的口服糖耐量曲线下面积,对大鼠的糖耐量受损有着显著缓解作用^[30]。通过肠道菌群优势菌定量QPCR发现,LCZ干预显著增加肠道有益菌乳杆菌和双歧杆菌数量并降低梭菌数量。进一步机制研究显示,LCZ可以减少肠道对果糖的吸收,下调肠道激素GLP-2水平,进而降低体重和血清胰岛素水平产生预防效应。对于已经糖耐量受损的大鼠,LCZ干预增加了脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)的数量,同时血清骨钙素水平上调,从而改善口服糖耐量水平。我们推测脆弱拟杆菌产生的维生素K2可能是骨钙素水平上调的一个原因。

基于LCZ对糖耐量受损的良好结果,接着直接

研究了对2型糖尿病的预防作用. 使用短期高脂高糖膳食联合低剂量STZ注射模型模拟2型糖尿病的发病进程. 结果发现, LCZ干预对SD大鼠空腹血糖、餐后2 h血糖、口服葡萄糖耐量(OGTT)水平有着显著的改善作用. 通过肠道菌群优势菌定量QPCR发现, LCZ干预减少了胆酸7 α 羟化菌*Eubacterium rectale*-*Clostridium coccoides* cluster, *Eubacterium rectale*和*Clostridium scindens*的数量, 同时与它们显著关联的肠道代谢物初级胆汁酸(胆酸和鹅去氧胆酸)水平显著上调和次级胆汁酸(石胆酸和脱氧胆酸)水平下调^[31]. LCZ进一步激活抗炎分子胆酸受体TGR-5, 增加了胆酸与氯离子的交换, 促进组织氯离子的内流进而对组织产生保护作用. 所以得出LCZ对胆汁酸代谢以及相关菌群的调节是降低对2型糖尿病敏感性的重要原因.

3 益生功能评价与肠道菌群组学结合的阶段

前5年, 伴随着第二代测序技术(“Next-generation” sequencing technology, 如罗氏454焦磷酸测序平台和Illumina/Hiseq2500)的迅猛发展, 肠道菌群领域研究成为最热的领域. 基于单分子簇的边合成边测序的二代测序技术优点是拥有较长读长(200~400 bp), 短时间内获得较高精确度的海量数据. 运用454焦磷酸测序技术, Zhang等人^[32,33]通过小规模人群试验评价了LCZ对不同年龄人群肠道微生物群落的影响. 24个健康志愿者分为3组, 青年组、中年组和老年组, 他们接受4周的LCZ干预和接下来2周的安慰剂试验, 每组8个人完成研究. 结果表明, 每个人的肠道菌群都发生了显著改变, 即使在不摄入益生菌的2周(28~42 d)里, 益生菌对肠道菌群结构的改变效应基本保持. LCZ干预对肠道菌群多样性有着重要的影响. LCZ干预显著增加了有益菌如双歧杆菌(*Bifidobacterium*)、短链脂肪酸产生菌(*Prevotella*和*Propionibacterium*)和抗炎细菌*Faecalibacterium*的丰度. LCZ与肠道中*Phascolarctobacterium*的数量呈负相关的关系. 同时下调了条件致病菌*Clostridium*, *Serratia*, *Enterococcus*, *Shigella*和*Shewanella*的丰度^[33].

近年来, 随着二代测序技术逐渐成熟和稳定后, 基于单分子测序的三代测序技术得到迅猛发展. 二代测序需要进行PCR扩增, 同时读取长度较短, 细菌变化只能归到属水平. 而第三代测序具有16S rRNA全长读取、测序时间短的优点, 同时省去了PCR扩

增环节, 极大地减少了测序的错误率, 细菌分类还可以精确到种水平, 为精细化定位肠道菌群组成提供了便利. 我们的一项研究证明了LCZ对实验小鼠炎症性相关结肠癌具有良好的预防效应^[34]. 使用最新的三代Pacbio测序平台发展的肠道菌群16S rRNA全长测序技术, 发现LCZ对肠癌造模后小鼠的肠道菌群具有显著调节作用, 是预防结肠癌发生的核心因素. 在门水平, LCZ增加了拟杆菌/硬壁菌比例. 在种水平, LCZ减少了肠癌造模后小鼠风险菌*Helicobacter apodemus*(高山姬鼠螺杆菌), *Helicobacter mesocricetorum*(仓鼠螺杆菌), *Allobaculum sterco-ricanis*和*Adlercreutzia equolifaciens*的丰度. 对潜在有益菌*Alloprevotella rava*(灰色拟普雷沃菌)和*Parabacteroides merdae*有着提升作用. LCZ还影响了肠癌造模后小鼠肠道菌群的代谢产物组成, 关键是可以显著增加肠道丁酸的水平, 激活TGF- β /CLIC4抗癌信号通路, 合并CLCN3抗炎信号分子, 对炎症相关结肠癌的发生发展起到重要的预防作用.

益生菌的功能需要严谨临床研究的证据支持, 尤其是大规模的人群试验. 2016~2017年, 在马来西亚开展了为期一年的一项LCZ对健康人群健康效应的随机双盲安慰剂对照人群试验. 试验纳入了165位健康志愿者, 分别归类为中青年组($n=90$)和老年组($n=75$). 经过长达一年的LCZ干预以及每月进行问卷调查, 结果发现LCZ中青年干预组鼻腔症状发生次数、呼吸道症状发生天数、流感症状发生次数和口腔炎症症状显著降低, 表明LCZ干预对上呼吸道感染发生具有显著预防作用. 同时, LCZ干预使得老年志愿者每周肠道排便次数显著增加, 鼻腔症状发生次数显著减少, 提高老年志愿者的血液流动速度标记物ESR(红细胞沉降率)和血红蛋白标记物MCHC(红细胞平均血红蛋白浓度), 预防老年组衰老的炎症前反应^[35].

血液细胞因子进一步分析表明, LCZ干预使得中青年组抗炎因子IL-4和IL-10水平以及免疫球蛋白IgG水平上调, 改善免疫分子CD4, CD8, CD27和CXCR5的表达, 可以改善Th1/Th2平衡增加免疫抵抗作用. LCZ可以增加老年组抗炎因子IL-4水平, 改善CD44的表达^[35]. 肠道宏基因组学数据结果初步显示, 摄入LCZ使中青年志愿者肠道菌群更为稳定、不会随着季节的变化而出现大的波动. 而摄入LCZ可以降低老年志愿者肠道菌群年龄指数(未发表数据).

4 展望

20世纪90年代初, 益生菌被定义为“一种活的微生物, 摄入足够量后对宿主产生有益作用”。近年来, 随着多组学技术的发展, 益生菌的真实定义已经在逐渐发生着改变。但是其中争议不少, 至今还未形成统一的观点。多位科学家的共识是益生菌作为一个特殊群体, 其益生功能有共性, 但也存在着很大的菌株特异性。更需要重视的是, 由于近年来组学技术对肠道菌群与宿主相互作用认识的不断加深, 益生菌的益生功能仅仅只是开发了一小部分, 还需要通过寻找合适的动物模型, 加强对其作用机理的研究, 将来应用于临床。

LCZ的研究历程分为3个重要的阶段, 目前已经

成为研究较为充分的一株益生菌(表1)。但是还有很多未知的领域值得探索。与应用最早的益生菌 *Lactobacillus casei* Shirota相比, LCZ的耐受性同样很强, 同时LCZ同样可以调节肠道菌群和免疫、降低肥胖大鼠口服糖耐量水平和对小鼠结肠癌产生预防作用。但是其作用机制不尽相同, LCZ对宿主氯离子相关蛋白的调节与益生菌布拉迪酵母的作用机制相类似^[40]。目前LCZ正在开展多项动物实验, 比如益生菌对体内葡萄糖和铁转运蛋白的作用。这样为进一步探索益生菌的作用机理提供基础。更重要的是, 益生菌对人体健康的益生效应正在得到不断的扩充。目前LCZ正在与多家医院合作开展10多项临床实验, 包括改善高尿酸血症、肠易激综合征(IBS)、炎症性

表1 益生菌LCZ研究历程

Table 1 Research course of probiotic LCZ

时间	LCZ	实验类型和肠道分析	文献
第一阶段: 单菌株组学体外评价阶段			
2002年	分离和筛选	体外实验	[11]
2008年	全基因组测定	体外实验	[15]
2009年	LCZ与多株益生菌体外益生活性比较	体外实验	[13]
2009~2011年	LCZ 生长、耐酸耐胆盐比较蛋白组学	体外实验	[16~18]
2009年	LCZ发酵马乳特性和胃肠道转运耐受性	体外实验	[36]
2009年	LCZ发酵豆乳和牛乳特性以及体外胃肠道转运耐受性	体外实验	[37]
2010年	LCZ发酵契达干酪的ACE抑制活性和 γ 氨基丁酸产生	体外实验	[38]
2013年	LCZ调节巨噬细胞活性	体外细胞实验	[24]
第二阶段: 肠道优势菌结合益生功能体内评价阶段			
2006年	LCZ调节正常小鼠免疫功能IgG和肠黏膜SIgA	动物实验	[39]
2008年	LCZ调节免疫功能	动物实验	[23]
2010年	LCZ抵抗脂质过氧化	动物实验	[26]
2010年	LCZ对肝癌荷瘤小鼠的抑癌作用	动物实验	[25]
2012年	LCZ降低血脂水平试验	动物实验肝脏芯片	[28]
2014年	LCZ改善糖耐量受损	动物实验肠道优势菌Q-PCR	[30]
2014年	LCZ抵抗二型糖尿病	动物实验肠道优势菌Q-PCR	[31]
第三阶段: 益生功能评价与肠道菌群组学结合的阶段			
2014年	LCZ调节不同年龄段人体肠道菌群	小人群试验; 肠道菌群454焦磷酸测序	[32,33]
2015年	LCZ抵抗乳房炎	动物实验肠道宏基因组学测序	待发表
2017年	LCZ减少脂肪累积	动物实验肠道宏基因组学测序	待发表
2017年	LCZ抵抗动物结肠癌效应	动物实验肠道16SrDNA三代测序	[34]
2017年	LCZ调节肠道慢性炎症	动物实验肠道16SrDNA三代测序	待发表
2018年	LCZ预防呼吸道感染和改善老年人群红细胞	马来西亚人群; 165人随机双盲安慰剂对照试验; 肠道宏基因组学测序	[35], 测序数据待发表
2018年	LCZ改变人体肠道微生物转录	小人群样本; 肠道宏基因组学和宏转录组学测序	待发表

肠病(IBD)、癌症放化疗副作用、2型糖尿病辅助治疗和改善肾病等方面. 主要从肠道菌群宏基因组角度解析益生菌LCZ对哪些人群产生健康的作用. 未来几年, LCZ的益生功能将会得到精准化的解析并应用于个性化的治疗.

在产业化应用方面, LCZ高纯度活性冻干粉已经工业化稳定生产, 菌数保持在 3.0×10^{11} CFU/g以上,

完全可以满足作为直投式发酵剂的条件. 下一步需要继续提高菌粉在货架期的稳定性. 一款以豆乳为基质的益生菌LCZ液体饮料也已经工业化生产, 菌数保持在 1.0×10^9 CFU/mL以上, 活菌数远远高于其他益生菌褐乳饮料的活菌数($1.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^8$ CFU/mL). 而且豆乳饮料更符合亚洲人的口味习惯和兼具豆类保健功能, 未来会受到更多消费者的青睐.

参考文献

- 1 Cani P D, Delzenne N M. The gut microbiome as therapeutic target. *Pharmacol Ther*, 2011, 130: 202–212
- 2 Panwar H, Calderwood D, Grant I R, et al. *Lactobacillus* strains isolated from infant faeces possess potent inhibitory activity against intestinal alpha- and beta-glucosidases suggesting anti-diabetic potential. *Eur J Nutr*, 2014, 53: 1465–1474
- 3 Larsen B, Monif G R. Understanding the bacterial flora of the female genital tract. *Clin Infect Dis*, 2001, 32: e69–e77
- 4 Karimi G, Sabran M R, Jamaluddin R, et al. The anti-obesity effects of *Lactobacillus casei* strain Shirota versus Orlistat on high fat diet-induced obese rats. *Food Nutr Res*, 2015, 59: 29273
- 5 Ashraf R, Shah N P. Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2014, 54: 938–956
- 6 Dos Reis S A, da Conceição L L, Siqueira N P, et al. Review of the mechanisms of probiotic actions in the prevention of colorectal cancer. *Nutr Res*, 2017, 37: 1–19
- 7 Dong J, Zhang Y, Zhang H. Chapter 2: Health properties of traditional fermented Mongolian milk foods. In: Liong M T, ed. *Beneficial Microorganisms in Food & Nutraceutical*. Netherlands: Springer, 2015
- 8 Kozhakhmetov S, Tynybayeva I, Baikhanova D, et al. Metagenomic analysis of koumiss in Kazakhstan. *Cent Asian J Glob Health*, 2014, 3(Suppl): 163
- 9 Yao G, Yu J, Hou Q, et al. A perspective study of koumiss microbiome by metagenomics analysis based on single-cell amplification technique. *Front Microbiol*, 2017, 8: 165
- 10 Chen Y, Wang Z, Chen X, et al. Identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from koumiss, a traditional fermented mare's milk. *J Dairy Sci*, 2010, 93: 884–892
- 11 Wu R, Wang L, Wang J, et al. Isolation and preliminary probiotic selection of lactobacilli from koumiss in Inner Mongolia. *J Basic Microbiol*, 2009, 49: 318–326
- 12 Piano M D, Morellic L, Strozzi G P, et al. Probiotics: From research to consumer. *Dig Liver Dis*, 2006, 38(Suppl 2): S248–S255
- 13 Guo Z, Wang J, Yan L, et al. *In vitro* comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. *LWT-Food Sci Technol*, 2009, 42: 1640–1646
- 14 Hamon E, Horvatovich P, Bisch M, et al. Investigation of biomarkers of bile tolerance in *Lactobacillus casei* using comparative proteomics. *J Proteome Res*, 2012, 11: 109–118
- 15 Zhang W, Yu D, Sun Z, et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus casei* Zhang, a new probiotic strain isolated from traditional homemade koumiss in Inner Mongolia, China. *J Bacteriol*, 2010, 192: 5268–5269
- 16 Wu R, Wang W, Yu D, et al. Proteomics analysis of *Lactobacillus casei* Zhang, a new probiotic bacterium isolated from traditional home-made koumiss in Inner Mongolia of China. *Mol Cell Proteomics*, 2009, 8: 2321–2338
- 17 Wu R, Zhang W, Sun T, et al. Proteomic analysis of responses of a new probiotic bacterium *Lactobacillus casei* Zhang to low acid stress. *Int J Food Microbiol*, 2011, 147: 181–187
- 18 Wu R, Sun Z, Wu J, et al. Effect of bile salts stress on protein synthesis of *Lactobacillus casei* Zhang revealed by 2-dimensional gel electrophoresis. *J Dairy Sci*, 2010, 93: 3858–3868
- 19 Koskeniemi K, Laakso K, Koponen J, et al. Proteomics and transcriptomics characterization of bile stress response in probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Mol Cell Proteomics*, 2011, 10: M110.002741
- 20 Alcántara C, Zúñiga M. Proteomic and transcriptomic analysis of the response to bile stress of *Lactobacillus casei* BL23. *Microbiology*, 2012, 158: 1206–1218
- 21 Guo H, Pan L, Li L, et al. Characterization of antibiotic resistance genes from *Lactobacillus* isolated from traditional dairy products. *J Food Sci*, 2017, 82: 724–730
- 22 Zhang W, Guo H, Cao C, et al. Adaptation of *Lactobacillus casei* Zhang to gentamycin involves an alkaline shock protein. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2316

- 23 Ya T, Zhang Q, Chu F, et al. Immunological evaluation of *Lactobacillus casei* Zhang: A newly isolated strain from koumiss in Inner Mongolia, China. *BMC Immunol*, 2008, 9: 68
- 24 Wang Y, Xie J, Wang N, et al. *Lactobacillus casei* Zhang modulate cytokine and toll-like receptor expression and beneficially regulate poly I:C-induced immune responses in RAW264.7 macrophages. *Microbiol Immunol*, 2013, 57: 54–62
- 25 Tuo Y, Du R T, Zhang H P. Antitumor effect and mechanism of probiotic *Lb.casei* Zhang on H22 tumor cell bearing mice (in Chinese). *Cancer Res Prev Treatment*, 2010, 37: 463–465 [托娅, 杜瑞亭, 张和平. 益生菌 *Lb.casei* Zhang 对 H22 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用及机制. *肿瘤防治研究*, 2010, 37: 463–465]
- 26 Zhang Y, Du R, Wang L, et al. The antioxidative effects of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang on the hyperlipidemic rats. *Eur Food Res Technol*, 2010, 231: 151–158
- 27 Zhang Y, Du R T, He Q W, et al. Effect of *Lactobacillus casei* Zhang administration on liver lipids metabolism of high-fat diet induced hypercholesterolemia rats (in Chinese). *Sci Agric Sin*, 2012, 45: 943–950 [张勇, 杜瑞亭, 何秋雯, 等. 饲喂益生菌 *Lactobacillus casei* Zhang 对高脂日量大鼠肝脏脂质代谢的作用. *中国农业科学*, 2012, 45: 943–950]
- 28 Zhong Z, Zhang W, Du R, et al. Effect of *Lactobacillus casei* Zhang on global gene expression in the liver of hypercholesterolemic rats. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2012, 114: 244–252
- 29 Wang Y, Li Y, Xie J, et al. Protective effects of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang against endotoxin- and d-galactosamine-induced liver injury in rats via anti-oxidative and anti-inflammatory capacities. *Int Immunopharmacol*, 2013, 15: 30–37
- 30 Zhang Y, Wang L, Zhang J, et al. Probiotic *Lactobacillus casei* Zhang ameliorates high-fructose-induced impaired glucose tolerance in hyperinsulinemia rats. *Eur J Nutr*, 2014, 53: 221–232
- 31 Zhang Y, Guo X, Guo J, et al. *Lactobacillus casei* reduces susceptibility to type 2 diabetes via microbiota-mediated body chloride ion influx. *Sci Rep*, 2014, 4: 5654
- 32 Kwok L Y, Wang L, Zhang J, et al. A pilot study on the effect of *Lactobacillus casei* Zhang on intestinal microbiota parameters in Chinese subjects of different age. *Benef Microbes*, 2014, 5: 295–304
- 33 Zhang J, Wang L, Guo Z, et al. 454 pyrosequencing reveals changes in the faecal microbiota of adults consuming *Lactobacillus casei* Zhang. *FEMS Microbiol Ecol*, 2014, 88: 612–622
- 34 Zhang Y, Ma C, Zhao J, et al. *Lactobacillus casei* Zhang and vitamin K2 prevent intestinal tumorigenesis in mice via adiponectin-elevated different signaling pathways. *Oncotarget*, 2017, 8: 24719–24727
- 35 Hor Y Y, Lew L C, Lau A S Y, et al. Probiotic *Lactobacillus casei* Zhang (LCZ) alleviates respiratory, gastrointestinal & RBC abnormality via immuno-modulatory, anti-inflammatory & anti-oxidative actions. *J Funct Foods*, 2018, 44: 235–245
- 36 Zhou Q, Wang J, Guo Z, et al. Fermentation characteristics and transit tolerance of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang in mare milk during storage. *Int J Dairy Technol*, 2009, 62: 249–254
- 37 Wang J, Guo Z, Zhang Q, et al. Fermentation characteristics and transit tolerance of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang in soymilk and bovine milk during storage. *J Dairy Sci*, 2009, 92: 2468–2476
- 38 Wang H K, Dong C, Chen Y F, et al. A new probiotic cheddar cheese with high ACE-inhibitory activity and γ -aminobutyric acid content produced with koumiss-derived *Lactobacillus casei* Zhang. *Food Tech Biotechnol*, 2010, 48: 1–3
- 39 Zhang H P, Zhang Q J, Menghe B, et al. Effect of oral administration of *L. casei* Zhang on T-lymphocyte subclass, serum IgG and intestinal mucous SIgA of mouse (in Chinese). *Chin Dairy Ind*, 2006, 34: 4–8 [张和平, 张七斤, 孟和毕力格, 等. *L.casei* Zhang 对小鼠 T 淋巴细胞亚群及血清 IgG 和肠黏膜 SIgA 的影响. *中国乳品工业*, 2006, 34: 4–8]
- 40 Sivananthan K, Petersen A M. Review of *Saccharomyces boulardii* as a treatment option in IBD. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2018, 17: 1–11

Summary for “从单菌株组学到宏基因组学: *Lactobacillus casei* Zhang 益生功能”

Probiotic effects of *Lactobacillus casei* Zhang: From single strain omics to metagenomics

Yong Zhang

Biology and Agriculture Research Center, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100024, China
E-mail: zhy-545@163.com

Lactobacillus casei Zhang (LCZ) is a well-studied probiotic bacterium that was inspired by traditional Mongolian medicine and isolated from naturally fermented koumiss in Inner Mongolia. There are three major stages of LCZ research and development. It contains single strain omics and *in vitro* evaluation stage (Stage 1), gut dominated microbes and *in vivo* evaluation stage (Stage 2) as well as metagenomics and clinical evaluation stage (Stage 3). LCZ was screened out from acid resistance, bile salt tolerance and processed favorable effects of *in vitro* cell adhesion characteristics and regulation of macrophage activity. And then, the whole genome of LCZ was determined and analyzed, which is the first identified *Lactobacillus* genome in China at 2008. Antibiotics resistance experiments showed a strong stability of LCZ genome under amoxicillin or gentamycin exposure through 2000 generations of laboratory evolution. A set of functional proteins such as *NagA* and *NagB* were identified from LCZ proteomics of growth process, acid stress or bile salt tolerance. Furthermore *in vivo* tests, LCZ has been demonstrated to process several beneficial effects including regulating microbiota abundance and ratios, lipid peroxidation inhibition and increasing antioxidant enzymes activities, regulating cellular and humoral immunity and tumor associated immune function, hepatoprotective effect and inhibition of liver transplanted tumor growth. Researchers have long appreciated the benefits of the gut microbiota to health. Moreover, LCZ was confirmed to promote the intestinal *Bacteroides* abundance and thereby alleviating impaired glucose tolerance and preventing type 2 diabetes mellitus by Q-PCR methods. Using the third generation PacBio sequencing technology, LCZ could delay the colon cancer progression in mice via altered gut microbiota composition and microbial acetic acid production. Detailedly, *Alloprevotella rava* and *Parabacteroides merdae* are the precise potential health-promoting species increased by LCZ intake. In addition to modulate gut microbiota composition, probiotic LCZ also manipulate bile acids, affects its conversation and induced tissue influx of chloride ion, which can impact the expression of chloride ion related proteins (eg. *CLCN3* and *CFTR*). Small-scale human trial indicated that LCZ could maintain the abundance of gut microbiota, increase the number of beneficial bacteria and reduce potential harmful bacteria via 454 pyrosequencing. In 2018, a large-scale, randomized, double-blind and placebo-controlled study was conducted by LCZ administration in Malaysian population. In adult subjects, it confirmed that LCZ could prevent upper respiratory tract infection including reducing the number of days for pharyngeal and general flu symptoms as well as nasal symptoms. In elderly populations, LCZ not only reduced nasal symptoms but also alleviated aged index including improving the mean corpuscular hemoglobin concentration and erythrocyte sedimentation rate. These are attributing to microbiota modulation and its mediated immunity such as increased anti-inflammatory IL-4. It is suggested that LCZ will exert more benefits in microbiota regulation and became a promising health food / special medical food for preventive or therapeutic effects.

***Lactobacillus casei* Zhang, probiotic effect, omics**

doi: 10.1360/N972018-00591