

左一帆, 肖萌, 苏香萍, 等. 副干酪乳杆菌润肠通便及调节肠道菌群作用 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 329–337. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090175

ZUO Yifan, XIAO Meng, SU Xiangping, et al. Effect to Intestinal Microbiota Regulation and Laxative Function to *Lactobacillus paracasei*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 329–337. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090175

· 营养与保健 ·

副干酪乳杆菌润肠通便及调节肠道菌群作用

左一帆¹, 肖萌¹, 苏香萍^{1,2,3,*}, 邹坤^{1,2}, 刘玲彦⁴, 谈亚丽⁴, 李啸⁴, 杨静⁵, 郑泽江¹
(1.三峡大学生物与制药学院天然产物研究与利用湖北省重点实验室, 湖北宜昌 443002;

2.三峡大学湖北省生物酵素工程技术研究中心, 湖北宜昌 443002;

3.杭州市中策职业学校钱塘学校, 浙江杭州 310020;

4.安琪生物科技股份有限公司, 湖北宜昌 443003;

5.三峡大学国家中医药管理局中药药理科研三级实验室; 三峡大学健康医学院, 湖北宜昌 443002)

摘要: 本文主要研究了西藏来源副干酪乳杆菌对小鼠便秘的润肠通便作用及其对肠道菌群的影响。首先将 160 只雄性昆明鼠随机分为 A、B 两大组, 每组又随机分为空白组、模型组、5 株实验菌株 (T1-5、T1-7、T1-9、T1-d、5B-1) 组和 6108 对照菌株组做润肠通便实验, 每组 10 只, 其中 A 组 80 只用于测定小鼠小肠推进率, B 组 80 只用于排便情况测定。然后挑选润肠通便效果好的菌株 T1-5、T1-9、5B-1 进行肠道菌群调节的检测, 实验小鼠为雄性 BALB/c 小鼠共 24 只, 分为空白组、T1-5 组、T1-9 组和 5B-1 组, 每组 6 只。润肠通便实验结果表明: 与模型组相比, T1-9 和 5B-1 组小鼠小肠推进率显著高于模型组 ($P < 0.01$); T1-9 组和 5B-1 组首次红便时间显著缩短 ($P < 0.01$); T1-9 组、5B-1 组以及对照菌株 6108 组 6 h 的排便颗粒数显著增加 ($P < 0.05$); T1-9 组和 6108 组的粪便湿重显著提高 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)。肠道菌群调节实验的测序结果显示, 与空白组相比, 三组益生菌组 T1-5、T1-9、5B-1 有益菌乳杆菌科、理研菌科丰度明显增加, 其中 5B-1 组有益菌普雷沃氏菌科丰度也明显增加。因此菌株 T1-5、T1-9、5B-1 能够促进肠道蠕动, 也具有调节肠道菌群结构发挥缓解小鼠便秘的作用。

关键词: 副干酪乳杆菌, 便秘, 润肠通便, 肠道菌群, 16S rDNA

中图分类号: Q939.97

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)21-0329-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090175

本文网刊:



Effect to Intestinal Microbiota Regulation and Laxative Function to *Lactobacillus paracasei*

ZUO Yifan¹, XIAO Meng¹, SU Xiangping^{1,2,3,*}, ZOU Kun^{1,2}, LIU Lingyan⁴, TAN Yali⁴, LI Xiao⁴,
YANG Jing⁵, ZHENG Zejiang¹

(1.Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Development, College of Biological & Pharmaceutical
Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, China;

2.Hubei Biological Enzyme Engineering Technology Research Center, China Three Gorges University,
Yichang 443002, China;

3.Hangzhou Zhongce Vocational School Qiantang, Hangzhou 310020, China;

4.Angel Biotechnology Co., Ltd., Yichang 443003, China;

5.Third-grade Pharmacological Laboratory on Traditional Chinese Medicine, State Administration of Traditional Chinese
Medicine, China Three Gorges University; College of Medicine and Health Sciences, China Three Gorges University,
Yichang 443002, China)

Abstract: The effects of five strains of *Lactobacillus paracasei* from Tibet on constipation and gut microbiota of mice were

收稿日期: 2023-09-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82204237)。

作者简介: 左一帆 (1999-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 微生物筛选与发酵, 功能食品活性评价, E-mail: zyfl491741239@163.com。

* 通信作者: 苏香萍 (1978-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 微生物菌种选育与发酵、活性评价, E-mail: xiangpingsu@ctgu.edu.cn。

studied. One hundred and sixty male Kunming mice were randomly divided into two groups: A and B. Each group was randomly divided into a blank subgroup, a model subgroup, five experimental strain (including T1-5, T1-7, T1-9, T1-d, and 5B-1) subgroup and a control strain 6108 subgroup for the laxative function test, with 10 mice in each subgroup. Among them, 80 mice in group A were used to measure the small intestine propulsion rate of mice, and 80 mice in group B were used to measure defecation status. Strains T1-5, T1-9, and 5B-1 with good performance in laxative function test were then selected to detect the regulation of intestinal microbiota and total 24 male BALB/c mice were selected for this experiment, and were divided into a blank subgroup, a T1-5 subgroup, T1-9 subgroup, and 5B-1 subgroup, with 6 mice in each subgroup. The experimental results of the laxative function test showed that: Compared with the model group, the small intestine propulsion rate of mice in T1-9 and 5B-1 groups was significantly higher than that of the model group ($P<0.01$). The first red stool time was significantly shortened in the T1-9 and 5B-1 groups ($P<0.01$). The number of fecal particles in the T1-9 group, 5B-1 group, and control strain 6108 group increased significantly at 6 h ($P<0.05$). The wet weight of feces in the T1-9 and 6108 groups increased significantly ($P<0.01$, $P<0.05$). The experimental results of the microbial community sequencing test showed that: compared with the blank group, the abundance of probiotics in the three strain groups T1-5, T1-9, and 5B-1 Lactobacillaceae and Rikenellaceae was significantly increased, including Prevotellaceae in the 5B-1 group. So, the conclusion are as follows: strains T1-5, T1-9 and 5B-1 can promote intestinal peristalsis, regulate the structure of intestinal microbiota, and alleviate constipation in mice.

Key words: *Lactobacillus paracasei*; constipation; laxative function; intestinal microbiota; 16S rDNA

便秘是临床上最常见的功能性胃肠疾病之一,主要表现为:大便结块或硬结,排便不畅,排便次数减少^[1]。随着人们生活水平的改善,不健康的生活方式及不良饮食习惯导致便秘的发生率逐年上升。据统计,全世界不同年龄段便秘的患病率从 0.5% 到 44.5% 不等^[2]。长期便秘,不仅会导致肛肠类疾病,还会对患者造成精神障碍,严重影响人们的生活质量和身心健康。现代医学治疗便秘的手段有限,主要包括食疗、内服药物治疗、外用润滑剂、灌肠以及手术治疗等,药物治疗往往会产生一系列不良反应,而手术疗法却并不适用于普通便秘患者^[3-4],因此,寻找疗效好且不良反应小的治疗方式极为重要。

副干酪乳杆菌作为益生菌的一种,具有改善宿主的肠道环境、维持菌群结构平衡、提高机体免疫力及抗氧化水平、保护调节肠道黏膜屏障等优点^[5]。同时,副干酪乳杆菌在 2010 年就被纳入可食用菌种名单,目前国内外市场对乳杆菌的需求量每年都在稳步增长,对其应用而言具有更强的研发价值。近年来国内外关于副干酪乳杆菌的研究主要集中在调节肠道菌群及缓解便秘^[6-14]。其他功效如副干酪乳杆菌 NTU101 乙醇提取物可抵抗牙周炎^[15], PS23 延缓衰老小鼠认知下降^[16] 已有相关报道。目前,副干酪乳杆菌部分菌株联合其它益生菌临床已有使用^[17-22],食品中应用主要集中在功能乳制品的添加^[23-24]。

乳制品作为益生菌的优良载体,已有上百年历史,有研究表明发酵乳制品中含有一些微生物,可以在人体胃肠道消化过程中存活并定植,发挥改善人体肠道功能的作用^[25-29]。从发酵乳中筛选具有优良益生特性的益生菌菌株不仅安全,而且简单易行,具有十分重要的意义。本研究以新分离鉴定于西藏山南市传统发酵乳制品中的副干酪乳杆菌菌株 T1-5、T1-7、T1-9、T1-d、5B-1 为研究对象,西藏地区具有严寒、强紫外和缺氧的特点,在这种环境下有利于筛

出抗逆性能较好的菌株。前期研究表明 5 株菌株均具有良好的耐酸、耐胆碱盐、耐人工胃液特性^[30],故本研究参考《允许保健食品声称的保健功能目录非营养素补充剂》(2020 年版)中的检验方法,通过小肠推进率实验、排便颗粒数实验探讨 5 株西藏来源的副干酪乳杆菌对便秘小鼠的润肠通便作用,选取润肠通便效果好的菌株进行肠道菌群调节实验,进一步评价 5 株菌株的促进肠道蠕动、调节肠道菌群能力,寻找更有效的预防便秘菌种,为开发有益人体健康的益生菌提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

本研究实验组为 5 株副干酪乳杆菌,其编号分别为 T1-5、T1-7、T1-9、T1-d、5B-1 由安琪生物科技有限公司提供,5 株实验菌株分离自西藏山南市传统发酵乳制品;6108 对照菌株 购于中国工业微生物菌种保藏中心 CICC;雄性 SPF 级昆明鼠,体重(20 ± 2 g),雄性 SPF 级 BALB/c 小鼠,体重(20 ± 2 g),许可证号: SCXK(鄂)2022-0021 均购于湖北省宜昌市三峡大学动物中心,饲养于三峡大学动物实验中心的屏障环境中,饲养环境温度保持在(22 ± 1)℃,相对湿度保持在(55 ± 15)%;盐酸洛哌丁胺胶囊 西安杨森制药有限公司;胭脂红、阿拉伯树胶 上海麦克林生化科技公司;活性炭粉、MRS 肉汤培养基、MRS 改良固体培养基 广东环凯生物科技有限公司。

AL204-IC 电子天平 上海梅特勒-托利多仪器有限公司;ZQLY-180V 电热恒温培养箱 上海知楚仪器有限公司;BCM-1000A 生物洁净工作台 天津市泰斯特仪器有限公司;H1850R 高速台式冷冻离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;SQ510C 高压蒸汽灭菌锅 重庆雅马拓科技有限公司;MX-F 固定式混匀仪 大龙兴创实验仪器股份公司;Lab-1B-50E 真空冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公

司; Mi Seq 高通量测序系统 美国 Illumina 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 将雄性昆明鼠分为空白组、模型组、T1-5 组、T1-7 组、T1-9 组、T1-d 组、5B-1 组、6108 组。每组 20 只, 共 160 只。实验共分两批次进行, 每组 10 只, 进行小肠推进率实验和排便颗粒数实验。

将雄性 BALB/c 小鼠随机分为空白组、T1-5 组、T1-9 组和 5B-1 组, 每组 6 只, 共 24 只, 进行肠道菌群调节实验, 动物实验伦理批号: 20220508C。

菌悬液制备: 将活化好的副干酪乳杆菌在 37 ℃ 条件下于 MRS 肉汤培养基中培养 20 h, 4 ℃ 8000 r/min 的条件离心 5 min, 除去上清液, 使用无菌水清洗菌体沉淀, 以相同的条件离心, 弃去上清液, 重复清洗 2 次, 菌体沉淀重悬于无菌水中, 使菌液浓度达到 1×10⁹ CFU/mL, 混合均匀后备用。

造模药物制备: 盐酸洛哌丁胺胶囊使用无菌水配制药液浓度为 0.4 mg/mL 和 0.7 mg/mL 的盐酸洛哌丁胺混悬液。

1.2.2 小肠推进率实验 小肠推进率实验按照《允许保健食品声称的保健功能目录非营养素补充剂》(2020 年版)中的通便功能检验方法进行检测。小鼠进驻动物房后适应性饲养 5 d, 再随机分成空白组、模型组和实验组。每天测定小鼠的体重调整灌胃量, 空白组和模型组给予 1 mL/10 g 的无菌水, 实验组分别给予 0.1 mL/10 g·bw 的相应菌悬液。灌胃干预 15 d 后, 禁食不禁水 24 h, 对小鼠小肠推进率进行测定, 模型组小鼠和实验组小鼠灌胃洛哌丁胺混悬液, 给药剂量为 4 mg/kg, 给药体积为 0.1 mL/10 g·bw, 空白组小鼠灌胃无菌水, 30 min 后, 按照相应的顺序给每只小鼠灌胃 0.5 mL 活性炭溶液, 25 min 后断颈牺牲。轻轻剪开小鼠腹腔, 取出从幽门至盲肠段, 用镊子将其拉直, 测量并记录小肠全长和活性炭推进最前端长度, 计算每只小鼠的小肠推进率。

小肠推进率(%)=活性炭推进长度/小肠总长度×100

1.2.3 排便颗粒数实验 排便颗粒数实验按照《允许保健食品声称的保健功能目录非营养素补充剂》(2020 年版)中的通便功能检验方法进行检测。具体方法同 1.2.2, 与其不同之处是给药剂量为 7 mg/kg, 实验第 16 d 各组小鼠每只灌胃 0.5 mL 洋红溶液, 记录每只小鼠灌胃洋红溶液的时间, 并将其放入干净且垫有吸水纸的笼盒中, 小鼠单笼饲养, 正常饮水进食, 从灌胃洋红开始计时, 记录小鼠首粒红便排出的时间、6 h 内排便粒数和排便重量及粪便含水量。

1.2.4 肠道菌群调节实验 肠道菌群调节实验按照《允许保健食品声称的保健功能目录非营养素补充剂》(2020 年版)中保健食品对肠道菌群调节作用的检测方法, 小鼠进驻动物房后先适应性饲养 5 d, 随机抽取 6 只小鼠无菌采集粪便 3~5 颗, 封装冻存于

-80 ℃ 冰箱, 作为自身前后对照空白组(A), 再将所有小鼠随机分成空白组(B)、T1-5 组(C)、T1-9 组(D)、5B-1 组(E)。每天测定小鼠的体重调整灌胃量, 实验组以 0.1 mL/10 g·bw 的灌胃体积连续灌胃相应菌悬液 15 d, 空白组给予蒸馏水。末次灌胃后, 同样方法采集各组小鼠粪便, 封装后置于-80 ℃ 冰箱。采样结束后干冰存放转送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行测序, 使用 DNA 提取试剂盒提取小鼠粪便的总 DNA, 并对 DNA 纯度、浓度和完整性进行检测。以稀释后的基因组 DNA 为模板, 采用 16S rDNA 扩增选择区域为基因 V3-V4 区特异性序列, 根据 PCR 产物浓度进行等量混样, 充分混匀后使用 1.8% 浓度的琼脂糖凝胶电泳纯化 PCR 产物。使用 NEB Next® Ultra™ II DNA Library Prep Kit 建库试剂盒进行文库构建, 将构建好的文库使用 Qubit/Agilent Bioanalyzer2100 System/Q-PCR 定量; 待文库合格后, 使用 NovaSeq6000 进行上机测序。

1.3 数据处理

本论文中实验数据均使用 Microsoft Excel 2019 通过“均数±标准差”(X̄±SD)来表示, 并使用 GraphPad Prism 8 分析并绘制图表, 组间采用单因素方差分析(one-way ANOVA), P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 小肠推进率实验结果

由表 1 可知, 与空白组相比, 模型组小肠推进率显著降低(P<0.01), 说明造模成功。灌胃 6 种副干酪乳杆菌后, 各组小肠推进率皆高于模型组, 其中菌株 T1-9、5B-1 的小肠推进率显著高于模型组(P<0.01), 说明灌胃菌株 T1-9、5B-1 能促进便秘小鼠的肠道蠕动。

表 1 副干酪乳杆菌对小鼠肠道推进的影响
Table 1 Effect of *Lactobacillus paracasei* on intestinal propulsion in mice

组别	小肠全长(cm)	活性炭推进长度(cm)	推进率(%)
空白组	54.76±5.06	35.52±7.11 [#]	65.10±13.18 ^{##}
模型组	54.41±4.09	16.02±1.52	29.60±3.67
T1-5	55.57±4.50	23.10±7.28	41.56±12.95
T1-7	52.76±6.42	18.60±5.00	36.01±11.40
T1-9	54.48±6.63	24.77±3.93	45.96±8.07 ^{##}
T1-d	48.91±4.75	21.38±8.28	41.14±15.18
5B-1	52.76±3.97	22.57±4.69	43.12±9.98 ^{##}
6108	52.19±4.52	18.80±6.19	35.86±10.21

注: #表示与模型组相比差异有显著性, P<0.05; ##表示与模型组相比差异有显著性, P<0.01; 表2同。

2.2 排便颗粒数实验结果

由表 2 可知, 模型组首次排红便时间与空白组小鼠相比显著升高、6 h 排便颗粒数和粪便湿重与空白组小鼠相比显著降低(P<0.01), 表明便秘模型小鼠造模成功。与模型组相比, T1-9 组和 5B-1 组首粒红便时间显著缩短(P<0.01); T1-9 组、5B-1 组以及

对照菌株 6108 组 6 h 排便颗粒数显著增多($P<0.05$); T1-9 组和对照菌株 6108 组的粪便湿重显著增加($P<0.01$ 、 $P<0.05$); 将各组小鼠粪便冻干后称量其粪便干重计算其含水率, 各组小鼠粪便含水率与模型组比较无显著性差异($P>0.05$)。

表 2 副干酪乳杆菌对小鼠排便情况的影响
Table 2 Effect of *Lactobacillus paracasei* on defecation in mice

组别	首粒红便时间 (min)	6 h 粪便 颗粒数	粪便湿重 (g)	含水率 (%)
空白组	73.20±26.19 ^{##}	41.00±13.74 ^{##}	0.71±0.22 ^{##}	0.58±0.11
模型组	200.70±64.02	12.60±4.86	0.24±0.13	0.49±0.06
T1-5	195.90±58.56	16.60±12.89	0.31±0.23	0.53±0.09
T1-7	167.44±56.42	19.60±10.28	0.30±0.15	0.55±0.09
T1-9	111.90±31.69 ^{##}	27.30±11.61 [#]	0.51±0.20 ^{##}	0.56±0.11
T1-d	181.20±28.00	19.90±5.93	0.32±0.09	0.46±0.02
5B-1	130.90±54.52 ^{##}	27.10±16.41 [#]	0.39±0.19	0.48±0.11
6108	171.70±57.75	27.80±13.41 [#]	0.48±0.16 [#]	0.46±0.08

《允许保健食品声称的保健功能目录非营养素补充剂》(2020 年版)中的通便功能检验方法中的结果判定表明, 6 h 内排粪便重量和粪便颗粒数任一结果阳性, 同时小肠运动实验和排首便时间任一结果阳性, 可判定该实验结果阳性。小肠推进率实验和排便颗粒数实验结果表明, 菌株 T1-9 和 5B-1 能一定程度改善小鼠的便秘症状, 促进便秘小鼠的肠道运动, 起到一定的润肠通便效果。结合小肠推进率实验, 菌株 T1-5 组活性炭推进长度高于 5B-1 组, 小肠全长高于 T1-9 和 5B-1 组, 推测可能是个体差异性导致 T1-5 组小肠推进率略小于 T1-9 和 5B-1 组。综合分析, 选择菌株 T1-5、T1-9 和 5B-1 进行肠道菌群实验。

2.3 肠道菌群实验结果

2.3.1 副干酪乳杆菌对小鼠肠道菌群多样性的影响
2.3.1.1 OUT 组成与分析 Venn 图是根据降噪得到的扩增子序列变体 (Amplicon Sequence Variants, ASVs) 结果, 分析不同组之间共有、特有的 ASVs, 图中每个圈代表一个组, 圈和圈重叠部分的数字代表组之间共有的 ASVs 个数, 没有重叠部分的数字代表每个组的特有 ASVs 个数。由图 1 可知, 共检测到 4061 个 ASVs, 5 个组之间共有的 ASVs 为 717 个, 自身前后对照空白组、空白组、T1-5 组、T1-9 组和 5B-1 组独有的 ASVs 数目分别为 358、439、434、

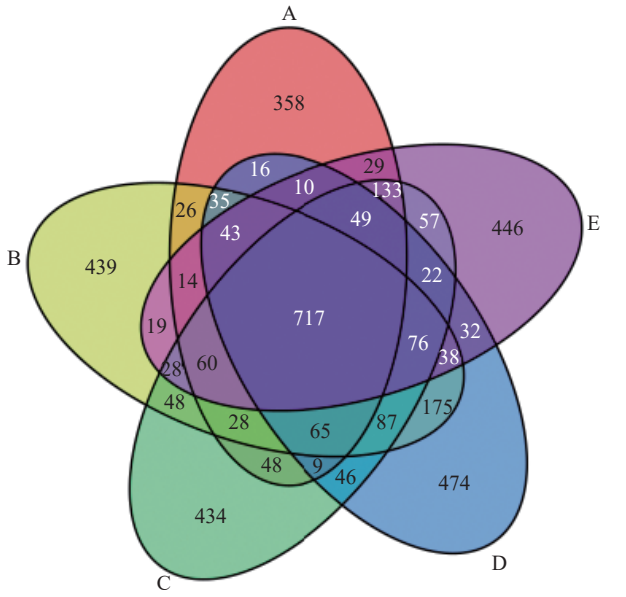


图 1 Venn 图分析

Fig.1 Venn plot analysis

注: (A)自身前后对照空白组, (B)空白组, (C)T1-5 组, (D) T1-9 组, (E)5B-1 组; 图 2~图 6、表 3~表 4 同。

474、446。上述数据表明与自身前后对照空白组相比, 在灌胃蒸馏水、副干酪乳杆菌 T1-5、T1-9 以及 5B-1 后, 各组独有的 ASVs 数目都有了一定的提高。同时, 菌株 T1-9 以及 5B-1 独有的 ASVs 数目高于经蒸馏水干预的空白组。

2.3.1.2 Alpha 多样性 Alpha 多样性 (Alpha Diversity) 反映的是样本内的微生物群落多样性, 通过对单个样品的多样性分析可以反映样本内的物种丰度 (Richness) 及物种多样性 (Diversity)。Alpha 多样性有多种衡量指标: Chao1、ACE、Shannon、Simpson、Pielou_e、Coverage。Coverage 指数可以反映群落覆盖率, 由表 3 可知 Coverage 指数趋近于 1, 表明本研究中样本序列基本被测出。ACE 指数和 Chao1 指数能反映出样本中群落种类的丰度, 常被用于估计物种总数, 由图 2A、图 2B 可知, 与自身前后对照空白组相比, 空白组和 T1-5 组、T1-9 组、5B-1 组 ACE 指数和 Chao1 指数均呈现升高趋势, 说明蒸馏水和益生菌干预的小鼠肠道微生物丰富度都有增加的趋势。Simpson 指数、Shannon 指数和 Pielou_e 指数用于衡量物种多样性, 受样品群落中物种丰度和物种均匀度的影响。Simpson 指数和 Shannon 指数值越

表 3 各组小鼠肠道菌群 Alpha 多样性指数
Table 3 Alpha diversity index of intestinal microbiota in each group of mice

组别	ACE	Chao1	Simpson	Shannon	Pielou_e	Coverage
A	700.52±83.00	712.17±84.42	0.95±0.03	6.56±0.58	0.70±0.05	0.9986
B	805.46±67.00	821.42±64.00 [*]	0.98±0.02 [*]	7.45±0.40 [*]	0.78±0.04 [*]	0.9984
C	789.24±72.01	801.62±77.10	0.99±0.01 [*]	7.51±0.27 [*]	0.78±0.02 [*]	0.9985
D	751.06±96.46	757.83±101.56	0.99±0.00 [*]	7.66±0.30 [*]	0.81±0.03 [*]	0.9987
E	714.66±108.80	725.33±106.34	0.99±0.01 [*]	7.54±0.38 [*]	0.80±0.03 [*]	0.9988

注: *表示与自身前后对照空白组(A)相比差异有显著性, $P<0.05$ 。

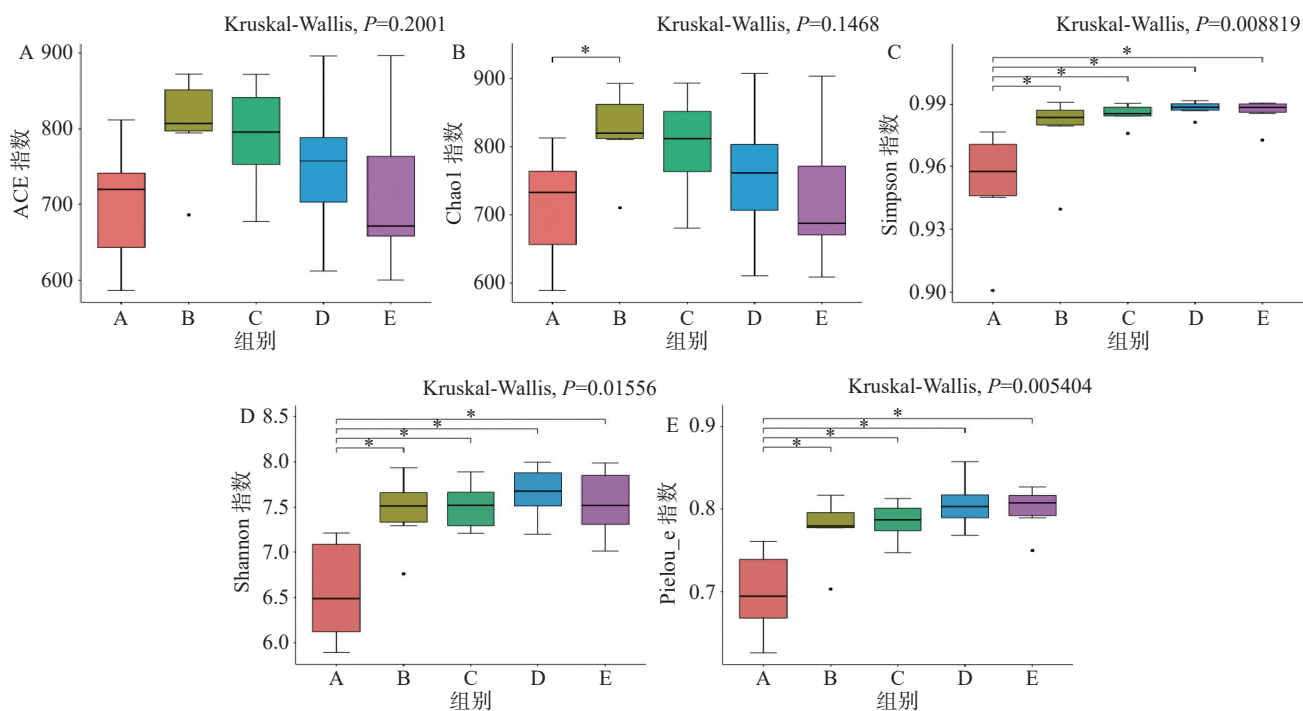


图 2 各组小鼠粪便中菌群 Alpha 多样性指数图

Fig.2 Alpha diversity index of microbial communities in feces of mice in each group

注: A: ACE 指数; B: Chao1 指数; C: Simpson 指数; D: Shannon 指数; E: Pielou_e 指数; *表示与自身前后对照空白组(A)相比差异有显著性, $P<0.05$ 。

大, 说明样品的物种多样性越高, Pielou_e 指数越大, 说明物种的均匀度越高。

由表 3 和图 2 的结果可知, 与自身前后对照空白组比较, 4 组 Simpson 指数、Shannon 指数和 Pielou_e 指数均显著升高 ($P<0.05$), 说明空白组和 T1-5 组、T1-9 组、5B-1 组菌落多样性均显著增加, 其中 3 组益生菌组 Pielou_e 指数均高于空白组, 表明菌株 T1-5、T1-9、5B-1 干预的小鼠肠道菌群多样性高于蒸馏水干预的同时, 经 3 种副干酪乳杆菌干预的小鼠菌群均匀度更大, 改善小鼠的肠道菌群效果更显著。

2.3.1.3 Beta 多样性 Beta 多样性是指沿着环境梯度变化的不同群落之间, 物种组成的相异性或物种沿环境梯度的更替速率, 因此也被称为生境间多样性 (Between-Habitat Diversity)。坐标分析 (Principal Co-ordinates Analysis, PCoA) 可以用于判断物种的组成相似程度, 物种组成越相似的样本, 其距离越接近。非度量多维尺度分析 (Non-metric Multi-Dimensional Scaling, NMDS) 能更好地反映生态学数据中的非线性结构, 倾向于比对各样本组之间的差异性。由图 3 可知, 不同颜色代表不同的样本, 其离散程度代表不同样本间的差异性。PCoA 分析结果表明, 与自身前后对照空白组相比, 空白组和益生菌组的样本明显分离, 表明菌群结构出现了一定的差异, 说明蒸馏水和 3 种副干酪乳杆菌均能改善小鼠的肠道菌群。同时益生菌各组内的样本离散程度比空白组更小, 说明其物种丰度更加均匀; 图 3B 中, NMDS 分析结果表明自身前后对照空白组的菌群与

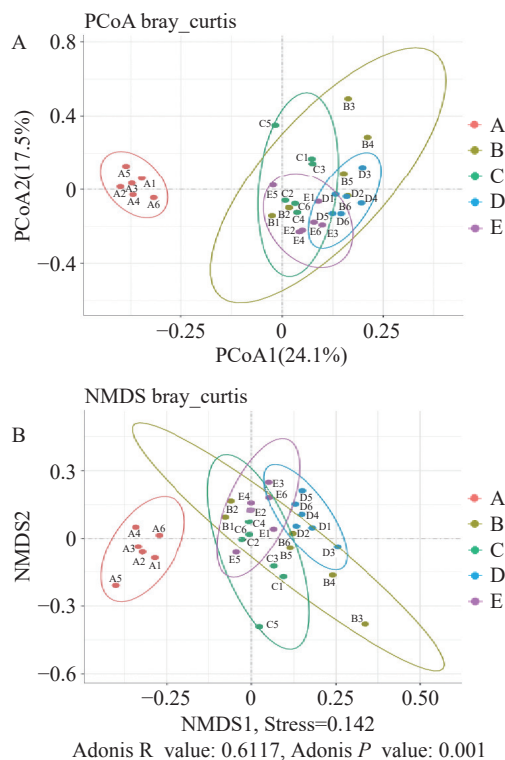


图 3 各组小鼠肠道菌群 PCoA(A)和非度量多维尺度 (NMDS)(B)分析

Fig.3 Analysis of intestinal microbiota PCoA (A) and non metric multidimensional scale (NMDS) (B) in each group of mice

其余各组分离, 与其他组距离较远, 和其他各组间相比具有显著性差异 ($P<0.001$), Stress<0.2 表明可以准确反映样本间差异程度。

2.3.2 各组小鼠肠道菌群物种组成及差异分析

2.3.2.1 门水平物种组成及差异分析 群落柱形图可以解释各组样本的优势物种及其相对丰度,图4为小鼠门水平前10菌群相对丰度柱状图,并将其他物种合并为 Others 在图中显示,不同颜色代表不同物种,色块长度表示物种所占相对丰度比例。在门水平上,拟杆菌门(Bacteroidota)和厚壁菌门(Firmicutes)是各组的优势物种,其次还有弯曲杆菌门(Campilobacterota)和变形菌门(Proteobacteria)。与自身前后对照空白组相比,空白组拟杆菌门相对丰度显著下降,益生菌组干预后拟杆菌门出现上升趋势,而厚壁菌门相对丰度下降,见图4。

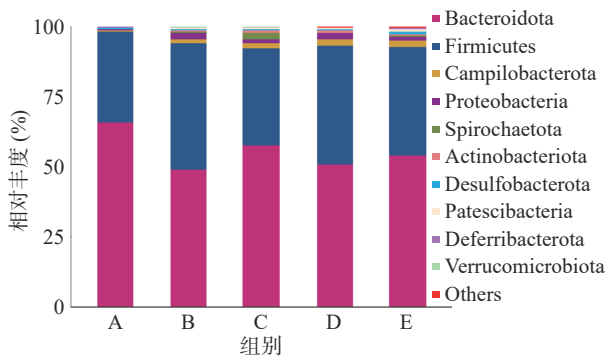


图4 门水平物种组成及差异分析
Fig.4 Analysis of species composition and differences at the phylum level

表4中关于各组小鼠肠道菌群在各级水平上的差异,在门水平上,与自身前后对照空白组相比,空白组和T1-9组厚壁菌门、弯曲杆菌门和变形菌门丰度显著提高,差异具有统计学意义($P<0.01$),T1-5组和5B-1组弯曲杆菌门和变形菌门丰度显著增加($P<0.01$),同时4组拟杆菌门丰度都显著减小($P<0.01$),其中益生菌组较空白组减少程度较轻,说明3株菌株均具有提高菌群的菌落丰度、调节肠道菌群结构的作用。

表4 小鼠粪便中不同微生物级别菌群的影响

Table 4 Effects of different microbial grades on microbial communities in mouse feces

外文名	中文名	A	B	C	D	E
Bacteroidota	拟杆菌门	659121.16±99503.54	489399.13±102819.01**	575692.75±129712.65***#	509555.05±93801.80**	541141.59±81185.53**
Firmicutes	厚壁菌门	324733.36±93884.28	451969.78±86907.48**	348774.40±101775.01###	422954.59±92146.00**	388632.47±78387.66
Campilobacterota	弯曲杆菌门	4083.91±1617.43	15291.97±4088.84**	21132.60±7395.43**	24736.82±5573.87***	17612.67±5511.09**
Proteobacteria	变形菌门	3720.89±515.78	27433±8626.38**	20134.32±7074.97**	27115.86±14345.58***	16108.75±5448.03***
Lactobacillaceae	乳杆菌科	29283.13±10896.18	78691.94±24928.98**	77520.79±31570.32**	81941.78±21313.17**	95170.18±63149.44**
Rikenellaceae	理研菌科	23745.01±4593.56	48164.19±7726.44**	50692.32±13548.76**	43678.37±4876.25*	68888.40±12439.32***
Prevotellaceae	普雷沃氏菌科	10060.68±2557.40	35947.03±14441.36	23513.80±7134.42	36716.28±11917.00	45649.02±25458.17*
Bifidobacteriaceae	双歧杆菌科	198.79±79.22	1305.12±633.73**	968.04±211.18*	2359.59±963.59***	267.94±53.98###
Enterobacteriaceae	肠杆菌科	129.65±25.93	207.44±144.37	146.93±65.26	69.15±53.98	164.22±91.06
Muribaculaceae	细菌属	598407.06±100995.26	366994.24±85330.09**	452734.71±107876.25***#	352737.30±71974.74**	345749.28±74746.87**
Lactobacillus	乳杆菌属	29283.13±10896.18	78691.94±24928.98**	77520.79±31570.32**	81941.78±21213.17**	95170.18±63149.32**
Alistipes	别样杆菌属	17787.69±3982.40	29940.02±13576.73	43254.85±13009.33	33604.73±13529.61	51089.91±12232.15*
Bacteroides	拟杆菌属	14235.34±4813.61	27502.64±10834.69	25726.46±9702.80	45830.52±16065.20	53051.91±16794.85**

注: *表示与自身前后对照空白组(A)相比差异有显著性, $P<0.05$; **表示与自身前后对照空白组(A)相比差异有显著性, $P<0.01$; #表示与空白组(B)相比差异有显著性, $P<0.05$; ##表示与空白组(B)相比差异有显著性, $P<0.01$ 。

2.3.2.2 科水平物种组成及差异分析 在科水平上, 各组小鼠优势菌群主要是 Muribaculaceae 属于拟杆菌科^[31]、毛螺菌科(Lachnospiraceae)、乳杆菌科(Lactobacillaceae)、理研菌科(Rikenellaceae)、颤螺旋菌科(Oscillospiraceae)等, 与自身前后对照空白组相比, 空白组和益生菌组毛螺菌科、乳杆菌科、拟杆菌科(Bacteroidaceae)、螺旋菌科(Helicobacteraceae)、理研菌科、普雷沃氏菌科(Prevotellaceae)等菌群丰度都明显升高, 分布情况见图5。

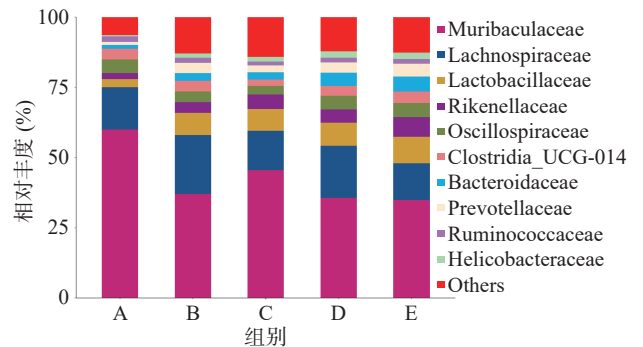


图5 科水平物种组成及差异分析
Fig.5 Analysis of species composition and differences at the family level

根据《允许保健食品声称的保健功能目录非营养补充剂》(2020年版)中调节肠道菌群功能检验方法中的结果判定表明, 粪便中双歧杆菌和(或)乳杆菌明显增加, 产气荚膜梭菌减少或不增加, 肠杆菌、肠球菌无明显变化或肠杆菌和(或)肠球菌明显增加, 但增加的幅度低于双歧杆菌或乳杆菌增加的幅度, 则判定为实验结果阳性。由表4可知, 与自身前后对照空白组比较, 空白组和3组益生菌乳杆菌科丰度显著增加($P<0.01$), 同时空白组、T1-5组和T1-9组双歧杆菌科丰度显著增加($P_{B,D}<0.01$ 、 $P_C<0.05$), 5B-1组双歧杆菌科丰度基本不变。与空白组相比, 3组益生菌组肠杆菌科(Enterobacteriaceae)丰度有

一定程度的减小。另外研究发现,与自身前后对照空白组比较,空白组和 3 组益生菌组干预后,有益菌理研菌科丰度显著增加($P_D < 0.05$ 、 $P_{B,C,E} < 0.01$),其中 5B-1 组有益菌普雷沃氏菌科丰度也显著增加($P < 0.05$),普雷沃氏菌科具有多种作用,包括减轻炎症、消化纤维素、产生短链脂肪酸如乙酸、丁酸等^[32];理研菌科对调节肠道健康有重要作用^[33]。综上,3 组益生菌组实验结果均为阳性,能增加有益菌理研菌和普雷沃氏菌丰度,减少有害菌肠杆菌等丰度,表明 3 种菌株均有调节肠道菌群的作用,具有一定开发为有益人体健康益生菌的价值。

2.3.2.3 属水平物种组成及差异分析 在属水平上,各组小鼠优势菌群主要是 *Muribaculaceae*、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、毛螺菌属(*Lachnospira*)、另枝菌属(*Alistipes*)、梭菌属(*Clostridia*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、普雷沃菌属(*Prevotella*)、螺杆菌属(*Helicobacter*)等,分布情况见图 6。与自身前后对照空白组相比,空白组和益生菌组另枝菌属、乳杆菌属、拟杆菌属、梭菌科 vadinBB60 属 *Clostridia*、毛螺菌科 NK4A136 属 *Lachnospiraceae* 等菌群丰度显著升高,表明益生菌可以提高各菌群的群落丰度,其中 T1-9 组和 5B-1 组干预后各菌群丰度增加幅度较大。

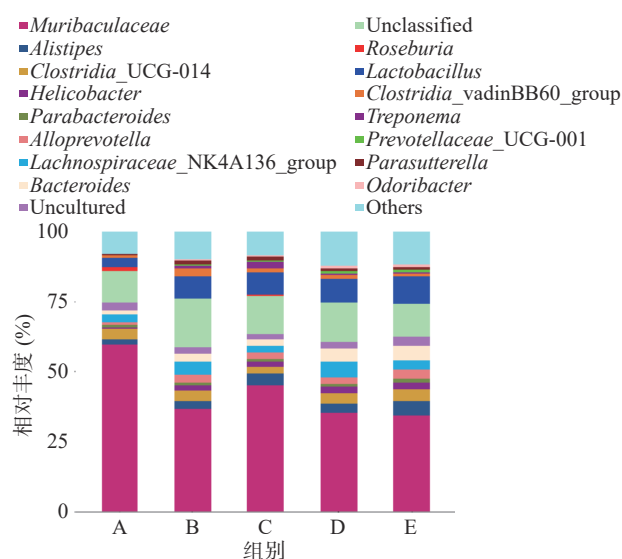


图 6 属水平物种组成及差异分析

Fig.6 Analysis of species composition and differences at the genus level

表 4 中关于各组小鼠肠道菌群在各级水平上的差异,在属水平上,与自身前后对照空白组相比,空白组和 3 组益生菌组乳杆菌属丰度显著增加($P < 0.01$),*Muribaculaceae* 属丰度显著降低($P < 0.01$),对应所属门水平拟杆菌门丰度显著降低($P < 0.01$),推测 3 株副干酪乳杆菌对拟杆菌门菌种有一定的抑制作用。在 3 组益生菌组中,5B-1 组拟杆菌属和别样杆菌属(*Alistipes*)丰度显著增加($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)。

综合门水平和科水平分析,益生菌干预后各组

小鼠肠道菌群均发生改变,提示 3 株副干酪乳杆菌可以调整肠道内菌群结构,增加有益菌丰度,减少有害菌梭菌 UCG-014 属 *Clostridia* 和肠杆菌等丰度,其中菌株 5B-1 调整菌群结构幅度最大,效果更显著。

3 结论

在小肠推进实验中,盐酸洛哌丁胺诱导的便秘模型小鼠体重无明显差别,因此实验对肠动力水平进行检测,发现与模型组相比,菌株 T1-9、5B-1 干预后,首粒红便时间显著减少($P < 0.01$),6 h 排便颗粒数显著提高($P < 0.05$);其中 T1-9 组粪便湿重显著增大($P < 0.01$)。在小肠推进实验中,6 种副干酪乳杆菌组小肠推进率皆高于模型组,其中菌株 T1-9、5B-1 的小肠活性炭推进效果较好,综上表明菌株 T1-9、5B-1 对促进肠胃蠕动、改善便秘小鼠粪便状态有较为明显的作用。基于此,后续肠道菌群调节实验选择作用明显的菌株 T1-9、5B-1 以及活性炭推进长度较长的菌株 T1-5。

在肠道菌群实验中,门水平、科水平和属水平结果表明 3 株益生菌都能够调节肠道菌群结构,增加有益菌理研菌和普雷沃氏菌等丰度,有害菌梭菌和肠杆菌丰度都有一定程度减少,其中菌株 5B-1 调整菌群结构幅度最大。综上所述,菌株 T1-5、T1-9、5B-1 具有促进肠蠕动、调整肠道菌群结构从而改善便秘的功能。在后续实验中,将对 3 株菌株功效及安全性进行系统研究,为其在食品中及更广泛的应用提供科学支持。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] LACY B E, MEARIN F, CHANG L, et al. Bowel disorders[J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(6): 1393–1407.
- [2] WERTH B. Epidemiology of constipation in adults: Why estimates of prevalence differ[J]. *Journal of Epidemiological Research*, 2019, 5(1): 37–49.
- [3] 张升彦, 张磊, 朱良如, 等. 基于肠道菌群的慢性便秘治疗进展[J]. 临床消化病杂志, 2022, 34(2): 149–152. [ZHANG Sheng-yan, ZHANG Lei, ZHU Liangru, et al. Progress in the treatment of chronic constipation based on gut microbiota[J]. *Chinese Journal of Clinical Gastroenterology*, 2022, 34(2): 149–152.]
- [4] 于淑俊, 张连中, 刘振权. 复合益生菌粉对功能性便秘小鼠润肠通便的作用[J]. 中国微生态学杂志, 2023, 35(2): 142–151. [YU Shujun, ZHANG Lianzhong, LIU Zhenquan. The effect of compound probiotic powder on moistening the intestines and relieving constipation in mice with functional constipation[J]. *Chinese Journal of Microbiology*, 2023, 35(2): 142–151.]
- [5] 张俊, 赵保堂, 杨富民. 副干酪乳杆菌的益生特性及其应用研究进展[J]. 包装与食品机械, 2019, 37(4): 47–52. [ZHANG Jun, ZHAO Baotang, YANG Fumin. Research progress on the probiotic characteristics and application of *Lactobacillus paracasei*[J]. *Pack-*

- aging and Food Machinery, 2019, 37(4): 47–52.]
- [6] 和明涓, 鲍悦悦, 倪敏. 干酪乳杆菌治疗功能性便秘的研究进展[J]. 临床医学研究与实践, 2023, 8(23): 191–194. [HE Mingjuan, BAO Yueyue, NI Min, et al. Research progress on the treatment of functional constipation with *Lactobacillus casei*[J]. Clinical Medical Research and Practice, 2023, 8(23): 191–194.]
- [7] LU Y, ZHANG J, ZHANG Z, et al. Konjac glucomannan with probiotics acts as a combination laxative to relieve constipation in mice by increasing short-chain fatty acid metabolism and 5-hydroxytryptamine hormone release[J]. Nutrition, 2021, 84(1): 1–13.
- [8] 陈建国, 李周勇, 李桂花, 等. 热灭活副干酪乳杆菌 Lc19 对小鼠便秘的缓解作用研究[J]. 中国奶牛, 2019(9): 12–15. [CHEN Jianguo, LI Zhouyong, LI Guihua, et al. Study on the relieving effect of heat-killed *Lactobacillus paracasei* Lc19 on constipated mice[J]. China Dairy Cattle, 2019(9): 12–15.]
- [9] 曹永强, 张健, 郑喆, 等. 副干酪乳杆菌 N1115 发酵乳对小鼠便秘的改善作用[J]. 食品科学, 2018, 39(1): 185–191. [CAO Yongqiang, ZHANG Jian, ZHENG Zhe, et al. Improvement effect of fermented milk from *Lactobacillus paracasei* N1115 on constipation in mice[J]. Food Science, 2018, 39(1): 185–191.]
- [10] 王晓成, 张明, 陈善斌, 等. 副干酪乳杆菌 L9 对小鼠肠道短链脂肪酸含量的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(13): 238–243. [WANG Xiaocheng, ZHANG Ming, CHEN Shanbin, et al. The effect of *Lactobacillus paracasei* L9 on the content of intestinal short chain fatty acids in healthy mice[J]. Food Science, 2017, 38(13): 238–243.]
- [11] 周晓丹, 刘爱萍, 张明, 等. 副干酪乳杆菌 LC-01 对便秘小鼠的通便作用[J]. 乳业科学与技术, 2012, 35(5): 7–11. [ZHOU Xiaodan, LIU Aiping, ZHANG Ming, et al. The laxative effect of *Lactobacillus paracasei* LC-01 in constipated mice[J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2012, 35(5): 7–11.]
- [12] BOSNEA L A, KOPSAHELIS N, KOKKALI V, et al. Production of a novel probiotic yogurt by incorporation of *L. casei* enriched fresh apple pieces, dried raisins and wheat grains[J]. Food and Bioprocess Processing, 2017, 102: 62–71.
- [13] 田丰伟, 杨震南, 丁历伟, 等. 副干酪乳杆菌 LC01 对人体肠道菌群的调节作用[J]. 中国食品学报, 2018, 18(10): 24–30. [TIAN Fengwei, YANG Zhennan, DING Liwei, et al. The regulatory effect of *Lactobacillus paracasei* LC01 on human intestinal microbiota[J]. Chinese Journal of Food Science, 2018, 18(10): 24–30.]
- [14] 陆文伟, 胡文兵, 曹文金, 等. 干酪乳杆菌 LC01 对小鼠肠道菌群和肠道转运调节作用的剂量效应[J]. 食品科学, 2019, 40(15): 211–217. [LU Wenwei, HU Wenbing, CAO Wenjin, et al. Dose effect of *Lactobacillus casei* LC01 on intestinal microbiota and intestinal transport regulation in mice[J]. Food Science, 2019, 40(15): 211–217.]
- [15] LIU T H, TSAI T Y, PAN T M. The anti-periodontitis effects of ethanol extract prepared using *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101[J]. Nutrients, 2018, 10(4): 472.
- [16] HUANG S Y, CHEN L H, WANG M F, et al. *Lactobacillus paracasei* PS23 delays progression of age-related cognitive decline in senescence accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice[J]. Nutrients, 2018, 10(7): 894.
- [17] 胡艳杰, 李卡, 杨家印, 等. 肝移植患者术后益生菌强化的早期肠内营养使用的最佳证据总结[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2020, 27(1): 63–68. [HU Yanjie, LI Ka, YANG Jiayin, et al. Summary of best evidence for early enteral nutrition use enhanced with probiotics in liver transplant patients after surgery[J]. Chinese Journal of Bases and Clinics in General Surgery, 2020, 27(1): 63–68.]
- [18] 朴善英, 徐小达. 肠道益生菌辅助对非酒精性脂肪性肝硬化患者糖脂代谢、氧化损伤和肝功能的影响[J]. 中国医学工程, 2019, 27(10): 102–104. [PIAO Shanying, XU Xiaoda. The effect of gut probiotic adjuvant therapy on glucose and lipid metabolism, oxidative damage, and liver function in patients with non-alcoholic fatty liver cirrhosis[J]. China Medical Engineering, 2019, 27(10): 102–104.]
- [19] 李萍, 张丽, 黄柳琴. 糜烂性胃炎幽门螺杆菌阳性患者益生菌联合四联疗法治疗后胃肠道微生态变化观察[J]. 现代消化及介入诊疗, 2019, 24(9): 961–964, 968. [LI Ping, ZHANG Li, HUANG Liuqin. Observation of changes in gastrointestinal microbiota after probiotic combined with quadruple therapy in *Helicobacter pylori* positive patients with erosive gastritis[J]. Modern Digestion & Intervention, 2019, 24(9): 961–964, 968.]
- [20] NES I F, JOHNSBORG O. Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2004, 15(2): 100–104.
- [21] 应再军. 术前补充益生菌对肠道手术患者术后肠道菌群及肠黏膜屏障功能的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2019, 31(9): 1052–1055. [YING Zaijun. The effect of preoperative supplementation of probiotics on postoperative gut microbiota and intestinal mucosal barrier function in patients undergoing intestinal surgery[J]. Chinese Journal of Microbiology, 2019, 31(9): 1052–1055.]
- [22] 王晓光, 石振东, 王国江. 益生菌联合益生元治疗老年慢性功能性便秘临床分析[J]. 中国临床新医学, 2014, 7(12): 1150–1152. [WANG Xiaoguang, SHI Zhendong, WANG Guojiang. Clinical analysis of probiotics combined with prebiotics in the treatment of elderly chronic functional constipation[J]. Chinese Journal of New Clinical Medicine, 2014, 7(12): 1150–1152.]
- [23] SÁNCHEZ E, NIETO J C, VIDAL S, et al. P0088: Fermented milk containing *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CNCM I-1518 reduces bacterial translocation in rats treated with carbon tetrachloride[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 45712.
- [24] CHIANG S S, LIAO J W, PAN T M. Effect of bioactive compounds in *Lactobacilli*-fermented soy skim milk on femoral bone microstructure of aging mice[J]. J Sci Food Agric, 2012, 92(2): 328–335.
- [25] YILMAZ I, DOLAR M E, OZPINAR H. Effect of administering kefir on the changes in fecal microbiota and symptoms of inflammatory bowel disease: A randomized controlled trial[J]. The Turkish Journal of Gastroenterology, 2019, 30(3): 242–253.
- [26] ESLAMI M, YOUSEFI B, KOKHAEI P, et al. Are probiotics useful for therapy of *Helicobacter pylori* diseases?[J]. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2019, 64: 1–30.
- [27] LIU C J, TANG X D, YU J, et al. Gut microbiota alterations from different *Lactobacillus* probiotic-fermented yoghurt treatments in slow-transit constipation[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 38: 110–118.
- [28] GOMI A, YAMAJI K, WATANABE O, et al. *Bifidobacterium bifidum* YIT 10347 fermented milk exerts beneficial effects on gastrointestinal discomfort and symptoms in healthy adults: A double-blind, randomized, placebo-controlled study[J]. Journal of Dairy Science, 2018, 101(6): 4830–4841.
- [29] BARROS C P, GUIMARES J T, ESMERINO E A, et al.

Paraprobiotics and postbiotics: Concepts and potential applications in dairy products[J]. *Current Opinion in Food Science*, 2020, 32: 1–8.

[30] 王帅静, 李啸, 刘玲彦, 等. 西藏牦牛粪和乳源中益生菌的筛选与鉴定[J]. 中国酿造, 2021, 40(7): 43–48. [WANG Shuaijing, LI Xiao, LIU Lingyan, et al. Screening and identification of probiotics in Tibetan yak manure and milk source[J]. *Chinese Brewing*, 2021, 40(7): 43–48.]

[31] 韩明明, 詹炜, 黄福勇, 等. 砂滤模式下马口鱼消化道细菌的组成、分类与相关性[J]. 浙江农业学报, 2023, 35(10): 2286–2298.

[HAN Mingming, ZHAN Wei, HUANG Fuyong, et al. Composition, classification, and correlation of bacteria in the digestive tract of zebrafish under sand filtration mode[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2023, 35(10): 2286–2298.]

[32] COX L M, YAMANISHI S, SOHN J, et al. Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences[J]. *Cell*, 2014, 158(4): 705–721.

[33] CUEVAS-SIERRA A, RIEZU-BOJ J I, GURUCEAGA E, et al. Sex-specific associations between gut *Prevotellaceae* and host genetics on adiposity[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(6): 938.