

益生菌制剂对抗生素诱导腹泻模型小鼠肠道菌群的恢复

金鑫¹, 葛亚中¹, 敬璞², 游丽君³

(1. 无限极(中国)有限公司, 广东广州 510665) (2. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240)

(3. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 为了评价益生菌制剂对腹泻模型小鼠肠道菌群的恢复, 现采用 22.4 g/(kg·d) 氨苄青霉素灌胃构造小鼠腹泻模型, 其中空白对照组灌胃等量生理盐水。造模成功后, 用低、中、高不同剂量的益生菌制剂对小鼠治疗恢复, 治疗 14 d 后, 观察益生菌制剂对小鼠稀便率、稀便级和腹泻指数的影响。无菌取治疗后 0、7、14 d 的小鼠粪便进行分析, 分别采用平板计数和 DGGE 技术检测肠道目标菌群变化。停用益生菌制剂后, 无菌采取 0、7、14 d 的粪便样品, 荧光定量 PCR 定量检测外源益生菌。结果表明, 益生菌制剂不仅能改善小鼠的腹泻情况, 促进腹泻小鼠的生长, 还对腹泻小鼠肠道菌群结构具有显著恢复作用; 荧光定量 PCR 检测结果表明外源益生菌嗜酸乳杆菌 NCFM、乳双歧杆菌 Bi-07 和鼠李糖乳杆菌 HN001 在停止灌胃益生菌制剂后可定殖存活, 但随着时间推移呈一定衰减的趋势。

关键词: 益生菌; 肠道菌群; BALB/c 小鼠; 腹泻模型

文章编号: 1673-9078(2017)7-17-24

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.7.003

The Effects of Probiotics on the Restoration of Intestinal Microflora in a Mouse Model of Antibiotic-induced Diarrhea

JIN Xin¹, GE Ya-zhong¹, JING Pu², YOU Li-jun³

(1. Infitinus (China) Co. Ltd., Guangzhou 510665, China) (2. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China) (3. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In order to evaluate the effects of probiotics on the restoration of intestinal microflora in a mouse model of diarrhea, 22.4 g/(kg/d) ampicillin was administered by gavage to construct the mouse model of diarrhea, and the blank control group was given saline at the same dosage. After the model was successfully constructed, low-, medium-, and high-dose probiotics were used to treat the mice to restore their intestinal microflora. The effect of probiotics on the loose stool rate, degree of loose stool, and diarrhea index were observed after 14 days of treatment. The aseptically collected fecal samples of mice at days 0, 7, and 14 after treatment were analyzed, and changes in the target intestinal flora were determined using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and plate counting methods. After the completion of probiotic treatment, the fecal samples of mice were collected aseptically at days 0, 7, and 14, and real-time fluorescent quantitative PCR (FQ-PCR) was carried out for the quantitative determination of exogenous probiotics. The results showed that probiotics not only mitigated diarrhea in mice and promoted mouse growth, but also exhibited a significant effect on the restoration of intestinal flora in mice with diarrhea. The results from FQ-PCR analysis indicated that the exogenous probiotics *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Bifidobacterium lactis* Bi-07, and *Lactobacillus rhamnosus* HN001 were able to colonize and survive after the administration of probiotics was stopped, but showed a certain downward trend over time.

Key words: probiotics; intestinal microflora; BALB/c mouse; diarrhea model

益生菌不仅可提高人体免疫力^[1], 且能产生确切

收稿日期: 2016-08-29

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2014A030313242); 中央高校科研业务费项目(2015ZZ110)

作者简介: 金鑫(1981-), 女, 硕士, 研究方向: 制糖工程

具有健康功效的次级代谢产物, 从而改善宿主微生态的平衡、发挥有益作用, 使得“益生菌类”保健品越来越受到人们的青睐。人体内肠道菌群失衡使人体处于亚健康状态^[2], 甚至引发糖尿病和高血压等慢性疾病。李旻^[3]利用 bar coded 454 测序技术研究了肠道菌群结

构变化与慢性代谢性疾病可能的相关性; Zhao 等^[4]认为肠道微生物的某些成员还能自身代谢或共同代谢产生一些类似于药物的化合物, 直接对人体的生理功能和免疫力产生影响。由此可见, 维持肠道菌群的平衡对人体健康具有重要意义, 而服用益生菌制剂可有效地维持肠道菌群平衡。益生菌制剂可通过分泌酶、营养物质及其抑制有害菌的次级代谢产物, 调整肠道内源微生物系统和预防系统, 从而直接或间接地改善肠道生理机能^[5]。如双歧杆菌和乳酸杆菌通过直接补充肠道内有益的正常生理性细菌以平衡肠道菌群, 阻止致病菌的入侵及繁殖。作为肠道内重要菌群, 益生菌不仅可提高肠道菌群的丰度^[6], 而且可以提高有益微生物的增殖, 使正常菌群的可持续变化最大化^[7]。因此, 保持肠道有益菌群的数量对宿主保持健康有重要作用^[8]。

由于抗生素的滥用, 导致肠道菌群失调, 而补充益生菌有助于恢复抗生素导致的肠道菌群失调^[9]。因此各国对益生菌的研究发展很快, 国外的研究多是乳酸杆菌、双歧杆菌、枯草杆菌及一些链球菌类的益生菌。而我国, 则以研究乳酸杆菌、芽孢杆菌为主。目前国内外市场上的益生菌产品, 主要以食品、保健品以及药品为主。

本研究探讨一种益生菌制剂对腹泻模型小鼠肠道菌群的恢复作用, 进而了解益生菌对肠道菌群的调节作用。本研究首先利用抗生素来诱导肠道菌群失调建立腹泻模型^[10], 再以不同剂量的益生菌治疗小鼠腹泻, 探讨益生菌制剂对抗生素诱导腹泻模型小鼠肠道菌群的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康的 SPF 级 BALB/c 小鼠 100 只, 三周龄, 雄性, 18 g~22 g。由上海杰思捷实验动物有限公司提供, 动物合格证号: 2010002605547。动物生产许可证号: SCXK (沪) 2013-0006 随机设计分为 5 组, 即: 空白对照组(5 只)、模型对照组(20 只)及三个试验组(75 只, 25 只/组)低剂量组、中剂量组、高剂量组(即: 益生菌剂 6.7、13.4、20 mg/d)。

1.2 药物

益生菌制剂(主要成分为菊粉、嗜酸乳杆菌 NCFM、乳双歧杆菌 Bi-07、山楂粉、山药粉、鼠李糖杆菌 HN001, 由无限极(中国)有限公司提供), 注射用氨苄青霉素(购于上海源叶生物)。

1.3 培养基

伊红美蓝(Eosin Methylene Blue, EMB)培养基、拟杆菌选择性(Bacteroid Selective, BDS)培养基、Tryptone Yeast Extract(TPY)琼脂培养基、胰月示-亚硫酸盐-环丝氨酸(Tryptose Sulfite Cycloserine, TSC)培养基、乳酸菌选择性(*Lactobacillus* Selective, LBS)琼脂和肠球菌琼脂均购自青岛海博生物技术有限公司。

1.4 方法

1.4.1 模型建立

BALB/c 小鼠适应性饲养 1 周后, 其中腹泻模型对照组 20 只和益生菌治疗组 75 只。每天以 22.4 g/kg (小鼠重量) 剂量的氨苄青霉素连续灌胃小鼠 5 d (2015 年 12 月 14~18 日), 每天两次, 每次剂量为 11.2 g/kg; 正常对照组 5 只小鼠每天同时间灌胃同体积的生理盐水作为参照。

造模成功的判断标准为: 毛发欠光泽, 采食量减少, 小鼠蜷缩, 活动较少, 反应较迟钝, 动作比较迟缓, 屁股有明显的污迹。

在腹泻模型建立和益生菌制剂治疗期间, 2015 年 12 月 14 日上午 8 点开始称重小鼠后, 进行氨苄青霉素灌胃; 其余时间每天下午 5 点开始, 称量各只小鼠质量并记录。

1.4.2 止泻试验

表 1 稀便级别判断标准

Table 1 Criteria to determine the degree of loose stool

污迹直径/cm	稀便级别
<1	1
1~1.9	2
2~2.9	3
3~3.9	4
4~4.9	5

第 6 d 观察各组小鼠并称量各只小鼠的造模后体重, 剔除造模不理想的小鼠, 剔除后模型对照组和各益生菌制剂治疗组的小鼠均为 15 只。第 6 d 各组小鼠进行给药前稀便点数实验: 禁食 12 h, 每组每只小鼠分别灌胃氨苄青霉素药液(0.3 g/mL) 25 mL/kg 体重, 空白对照组灌胃等量的生理盐水。此后放入观察笼中单只单笼观察(笼底铺有专用的滤纸), 记录灌胃氨苄青霉素药液后每只小鼠 5 h 内(笼底滤纸根据情况及时更换)的稀便数、干便数、粪便总数并测量各稀便的稀便级和各小鼠的腹泻指数。干(成形)便与稀(湿)便的判断以滤纸有无污迹为标准。

稀便率计算公式: 稀便率=一定时间内所排稀便

数/总排便数

腹泻指数计算公式：腹泻指数=稀便率×稀便级。

第7d(12月20日)开始，进行低、中、高剂量益生菌剂的灌胃治疗研究。每天灌胃1次，时间为上午9点开始，低剂量组为6.7 mg/d，中剂量组为13.4 mg/d，高剂量组为20 mg/d，连续灌胃治疗14 d。腹泻模型对照组和正常对照组皆灌胃等量的生理盐水。灌胃治疗14 d后，第15 d进行稀便点数实验，对稀便级、稀便率和腹泻指数进行计算。

1.4.3 小鼠粪便活菌计数

对益生菌制剂不同剂量、不同时间(0、7、14 d)治疗的腹泻模型小鼠的肠道菌群分布进行分析，无菌采取正常组和益生菌制剂治疗组的0、7、14 d粪便样品，将所有样品连续10倍稀释，稀释度分别为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7} 。上述每个稀释度取样0.2 mL涂布于LBS、TPY、EMB、肠球菌琼脂平板、TSC、37 °C厌氧培养48 h后分别对乳杆菌、双歧杆菌、肠杆菌、肠球菌和产气荚膜梭菌进行平板计数。

1.4.4 益生菌制剂对小鼠肠道菌群的影响

对益生菌制剂低、中、高剂量治疗组、正常对照组、腹泻模型对照组，不同时间(0、7、14 d)治疗的腹泻模型小鼠的肠道菌群分布进行分析，采用变性梯度凝胶电泳(Denatured Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)定量检测肠道菌群变化，判断益生菌制剂是否能够调节肠道菌群。

DGGE分析：无菌采取粪便样品，进行细菌总基因组提取，然后16S rDNA PCR扩增，最后将PCR产物进行变性梯度凝胶电泳分析，分析各种微生物的相对含量及其动态变化。

1.4.5 荧光定量PCR定量检测外源益生菌

停用益生菌制剂后，无菌采取低、中、高剂量治疗组0、7、14 d的粪便样品，进行总基因组提取，然后采用特异性引物对外源益生菌(嗜酸乳杆菌NCFM、乳双歧杆菌Bi-07、鼠李糖乳杆菌HN001)进行荧光定量PCR定量检测，查明外源益生菌在小鼠肠道中的生存数量拷贝数及其变化规律。

表2 荧光定量PCR引物信息

Table 2 Primers used for fluorescent quantitative PCR

引物名称	序列	备注
NCFM-F	5'-GGCAACGGTGGAAAGC-3'	嗜酸乳杆菌 NCFM
NCFM-R	5'-GGTTAGCCACCTCGCCT-3'	
Bi-07-F	5'-CACACCACACAATCCAATAC-3'	乳双歧杆菌 Bi-07
Bi-07-R	5'-GCATGTTGCCAGCGGGT-3'	
HN001-F	5'-TGCTTGCATCTTGATTAAATTTG-3'	鼠李糖乳杆菌 HN001
HN001-R	5'-GTCCATTGTGGAAGATTC-3'	

嗜酸乳杆菌 NCFM、乳双歧杆菌 Bi-07 和鼠李糖乳杆菌 HN001 的基因信息从 NCBI 上获得，利用 Primer 5.0 软件设计其特异性的上下游引物，引物信息见表2。普通PCR扩增条件为：95 °C(预变性5 min)；95 °C(30 s)，58 °C(30 s)，72 °C(1 min)，30个循环。实时定量PCR反应条件为，95 °C预变性10 s；95 °C变

性5 s，60 °C退火34 s，循环40次，20 μL体系。

1.4.6 统计学处理

实验数据用均数±标准差(±s)表示，采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析，不同实验组之间的差异分析采用 t 检验， $p < 0.05$ 为差异有显著性统计学意义， $p < 0.01$ 为差异有极显著性统计学意义。

表3 各组小鼠的体重情况

Table 3 Body weight of each mouse group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	造模前体重/g	造模后体重/g	造模期间体重增加量/Δg	灌服益生菌剂治疗期间(共14 d)			
				7 d后体重/g	1~7 d 体重增加量/Δg	14 d后体重/g	8~14 d 体重增加量/Δg
模型对照组	19.95±1.10	26.44±1.60	6.49±0.40	26.25±1.50	0.65±0.12	27.17±1.38	0.92±0.15
正常对照组	20.30±1.28	31.06±1.70	10.76±0.50Δ	32.32±1.28	1.04±0.23	33.30±1.28	0.98±0.22
低剂量组	19.66±0.63	26.05±0.91	6.39±0.20	31.28±1.00	6.03±0.19ΔΔ	35.61±0.85	4.33±0.28ΔΔ
中剂量组	19.29±0.80	25.55±1.60	6.27±0.27	33.27±1.26	8.52±0.81ΔΔ	37.16±0.97	3.89±0.32ΔΔ
高剂量组	19.88±0.54	26.33±0.90	6.45±0.20	35.29±0.98	9.78±0.28ΔΔ	37.84±0.80	2.55±0.23ΔΔ

注：与模型对照组比较， $\Delta p < 0.05$ ； $\Delta\Delta p < 0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 益生菌制剂对小鼠体重的影响

由表 3 可以看出,与模型对照组相比,造模期间各试验组体重变化无显著差异,而正常对照组体重增加明显,且差异显著($p<0.05$),这表明氨苄青霉素灌胃造模成功,并可严重影响小鼠的自然生长;在灌服益生菌制剂治疗前期,益生菌制剂各剂量组在治疗 7 d 的体重增加量远大于模型对照组,且差异显著($p<0.01$),而正常对照组与模型对照组两者体重增加量无显著差异,表明益生菌制剂治疗能显著增加腹泻小鼠的体重。与模型对照组相比,给药 14 d 后小鼠体重均有不同程度的升高,且差异显著;低、中、高剂量治疗组的体重增加量依次减少,这可能是由于治疗前期低剂量小鼠体重增加较少所致,与剂量无关。综上所述,益生菌制剂有利于腹泻小鼠的生长,而腹泻小鼠自我恢复生长的能力非常有限。

2.2 益生菌制剂对腹泻模型小鼠稀便率的影响

由表 4 可知,造模结束后,模型对照组稀便率为 $79.28\pm 8.77\%$,显著高于正常对照组($p<0.01$),而益生菌低剂量组、益生菌中剂量组和益生菌高剂量组的稀便率分别为 $81.48\pm 8.70\%$ 、 $78.68\pm 7.70\%$ 和 $80.42\pm 6.87\%$,与模型对照组无显著差异,表明模型构建成功。灌服益生菌制剂 14 d 后,益生菌低剂量组、益生菌中剂量组和益生菌高剂量组的稀便率分别为 $74.95\pm 2.71\%$ 、 $66.16\pm 2.99\%$ 和 $54.56\pm 2.99\%$,均有所下降,且与模型对照组的 $86.89\pm 1.98\%$ 比较,各

治疗组稀便率均有极显著的降低($p<0.01$),表明该益生菌制剂产品具有止泻功效,可以有效地降低腹泻模型小鼠的稀便率。

表 4 益生菌剂对腹泻模型小鼠稀便率的影响

Table 4 Influence of probiotic agents on loose stool rate of mice

组别	with diarrhea	
	造模后/%	给药 14 d 后/%
模型对照组	79.28±8.77	86.89±1.98
正常对照组	0.00±0.00ΔΔ	0.00±0.00ΔΔ
益生菌低剂量组	81.48±8.70	74.95±2.71ΔΔ
益生菌中剂量组	78.68±7.70	66.16±2.99ΔΔ
益生菌高剂量组	80.42±6.87	54.56±2.99ΔΔ

注:与模型对照组比较, $\Delta p<0.05$, $\Delta\Delta p<0.01$ 。

2.3 益生菌制剂对腹泻小鼠稀便级、腹泻指数的影响

由表 5 可知,造模结束后,模型对照组稀便级和腹泻指数分别为 1.67 ± 0.11 和 1.32 ± 0.18 ,显著高于正常对照组($p<0.05$);益生菌低剂量组稀便级和腹泻指数分别为 1.70 ± 0.09 和 1.38 ± 0.17 ,有显著差异($p<0.05$),而益生菌中剂量组和益生菌高剂量组的稀便率和腹泻指数与模型对照组均无显著差异,表明模型构建成功。灌服益生菌制剂 14 d 后,益生菌制剂低中高剂量组的稀便级分别为 1.58 ± 0.08 、 1.43 ± 0.06 和 1.30 ± 0.05 ,腹泻指数为 1.20 ± 0.07 、 0.95 ± 0.04 和 0.71 ± 0.05 ,稀便级和腹泻指数均有不同程度的下降,与模型对照组的稀便级和腹泻指数比较,具有显著性差异($p<0.01$)。结果表明该益生菌制剂产品对腹泻模型小鼠的腹泻状况有较好的改善作用。

表 5 益生菌剂对腹泻小鼠稀便级、腹泻指数的影响

Table 5 Influence of probiotic agents on the degree of loose stool and diarrhea index of mice with diarrhea

组别	稀便级		腹泻指数	
	造模后/%	给药 14 d 后/%	造模后/%	给药 14 d 后/%
模型对照组	1.67±0.11	1.83±0.10	1.32±0.18	1.59±0.10
正常对照组	1.00±0.00Δ	1.00±0.00ΔΔ	0.00±0.00Δ	0.00±0.00ΔΔ
益生菌低剂量组	1.70±0.09Δ	1.58±0.08ΔΔ	1.38±0.17Δ	1.20±0.07ΔΔ
益生菌中剂量组	1.66±0.07	1.43±0.06ΔΔ	1.30±0.15	0.95±0.04ΔΔ
益生菌高剂量组	1.67±0.08	1.30±0.05ΔΔ	1.34±0.15	0.71±0.05ΔΔ

注:与模型对照组比较, $\Delta p<0.05$, $\Delta\Delta p<0.01$ 。

2.4 腹泻模型小鼠肠道目标微生物的动态变化

腹泻模型成功建立后,灌胃不同剂量益生菌制剂,分别于 0、7、14 d,取粪便进行细菌平板计数及统计学分析,结果见表 6。

由表 6 中可知 0 d (造模后,进行益生菌制剂治疗

前), 模型对照组的肠道双歧杆菌、乳杆菌、肠杆菌、肠球菌和产气荚膜梭菌群数量分别为 5.72 ± 0.18 、 4.88 ± 0.31 、 7.86 ± 0.28 、 6.52 ± 0.23 和 6.99 ± 0.15 lg CFU/g, 正常对照组的肠道双歧杆菌、乳杆菌、肠杆菌、肠球菌和产气荚膜梭菌群数量分别为 7.85 ± 0.23 、 7.22 ± 0.13 、 6.83 ± 0.23 、 4.88 ± 0.17 和 5.68 ± 0.37 lg CFU/g, 相比于模型对照组, 正常对照组的乳杆菌和双歧杆菌数量显著减少($p<0.01$), 其他各组菌群数量都有不同程度的增加($p<0.01$), 模型对照组与正常对照组小鼠肠道菌群之间存在着显著性差异, 该结果证实通过灌胃氨

苜青霉素, 成功建立菌群失调模型。

模型对照组小鼠在灌胃生理盐水 7 d 后, 双歧杆菌、乳杆菌、肠杆菌、肠球菌和产气荚膜梭菌群数量分别为 7.18 ± 0.25 、 6.61 ± 0.32 、 7.41 ± 0.52 、 6.26 ± 0.51 和 6.41 ± 0.19 lg CFU/g (见表 6), 双歧杆菌和乳杆菌都有不同程度增殖, 肠杆菌、肠球菌和产气荚膜梭菌数量减少。但都仍低于正常组水平, 这说明氨苄青霉素造成的菌群失调症状, 在没有药物治疗的情况下有自我恢复的趋势, 但无法恢复到正常对照组水平。

表 6 腹泻模型小鼠肠道菌群均值

Table 6 Average bacterial colony count in the intestines of mice with diarrhea (lg CFU/g feces)

组别	时间/d	双歧杆菌	乳杆菌	肠杆菌	肠球菌	产气荚膜梭菌
模型对照组	0	5.72 ± 0.18	4.88 ± 0.31	7.86 ± 0.28	6.52 ± 0.23	6.99 ± 0.15
	7	7.18 ± 0.25	6.61 ± 0.32	7.41 ± 0.52	6.26 ± 0.51	6.41 ± 0.19
	14	7.12 ± 1.06	6.64 ± 0.81	7.38 ± 0.97	6.33 ± 0.72	6.30 ± 0.92
正常对照组	0	$7.85\pm 0.23\Delta\Delta$	$7.22\pm 0.13\Delta\Delta$	$6.83\pm 0.23\Delta\Delta$	$4.88\pm 0.17\Delta\Delta$	$5.68\pm 0.37\Delta\Delta$
	7	$7.84\pm 0.39\Delta$	$7.18\pm 0.19\Delta$	$6.91\pm 0.37\Delta$	$4.83\pm 0.25\Delta$	$5.72\pm 0.41\Delta$
	14	$7.81\pm 0.43\Delta$	$7.18\pm 0.41\Delta$	$6.87\pm 0.19\Delta$	$4.79\pm 0.32\Delta$	$5.71\pm 0.46\Delta$
益生菌低剂量组	0	5.71 ± 0.22	4.92 ± 0.35	7.82 ± 0.16	6.54 ± 0.19	7.01 ± 0.52
	7	$7.53\pm 0.41\Delta\Delta$	$6.99\pm 0.31\Delta\Delta$	7.29 ± 0.48	$5.07\pm 0.34\Delta\Delta$	6.15 ± 0.32
	14	$7.68\pm 0.37\Delta\Delta$	$7.19\pm 0.28\Delta\Delta$	$6.93\pm 0.46\Delta\Delta$	$4.91\pm 1.01\Delta\Delta$	$5.89\pm 0.27\Delta\Delta$
益生菌中剂量组	0	5.75 ± 0.32	4.89 ± 0.29	7.75 ± 0.31	6.53 ± 0.19	7.03 ± 0.26
	7	$7.73\pm 0.17\Delta\Delta$	$7.25\pm 0.29\Delta\Delta$	$7.17\pm 0.15\Delta\Delta$	$5.21\pm 0.22^*\Delta\Delta$	$5.97\pm 0.46\Delta\Delta$
	14	$7.82\pm 0.65\Delta\Delta$	$7.24\pm 0.63\Delta\Delta$	$6.82\pm 0.69\Delta\Delta$	$4.91\pm 0.81\Delta\Delta$	$5.66\pm 0.21\Delta\Delta$
益生菌高剂量组	0	5.73 ± 0.21	4.86 ± 0.18	7.94 ± 0.46	6.56 ± 0.22	6.97 ± 0.31
	7	$7.87\pm 0.27\Delta\Delta$	$7.23\pm 0.45\Delta\Delta$	$7.19\pm 0.26\Delta\Delta$	$5.24\pm 0.46\Delta\Delta$	$5.93\pm 0.24\Delta\Delta$
	14	$7.84\pm 0.39\Delta\Delta$	$7.27\pm 0.35\Delta\Delta$	$6.90\pm 0.77\Delta\Delta$	$4.82\pm 0.37\Delta\Delta$	$5.65\pm 0.88\Delta\Delta$

注: 与模型对照组比较, $\Delta p<0.05$; $\Delta\Delta p<0.01$ 。

益生菌制剂低剂量灌胃治疗小鼠 7 d 后, 双歧杆菌、乳杆菌数量分别为 7.53 ± 0.41 、 6.99 ± 0.31 lg CFU/g, 显著高于模型对照组($p<0.01$) (表 6), 但仍低于正常对照组, 肠杆菌、肠球菌和产气荚膜梭菌数量分别为 7.29 ± 0.48 、 5.07 ± 0.34 和 6.15 ± 0.32 lg CFU/g, 低于模型对照组, 且肠球菌具有显著性差异($p<0.01$) (表 6), 但各指标菌群数量与正常组还存在较大差异, 这说明低剂量益生菌制剂对小鼠肠道菌群有一定的调整作用。

用中、高剂量的益生菌制剂灌胃治疗小鼠 7 d 后, 益生菌中剂量组的双歧杆菌和乳杆菌分别为 7.73 ± 0.17 和 7.25 ± 0.29 lg CFU/g, 益生菌高剂量组的双歧杆菌和乳杆菌分别为 7.87 ± 0.27 和 7.23 ± 0.45 lg CFU/g, 中、高剂量组的双歧杆菌和乳杆菌都有很大程度的增殖, 明显高于模型对照组($p<0.01$) (表 6); 益生菌中剂量组的肠杆菌、肠球菌、产气荚膜梭菌数

量分别为 7.17 ± 0.15 、 5.21 ± 0.22 、 5.97 ± 0.46 lg CFU/g, 益生菌高剂量组的肠杆菌、肠球菌和产气荚膜梭菌数量分别为 7.19 ± 0.26 、 5.24 ± 0.46 、 5.93 ± 0.24 lg CFU/g, 中、高剂量组的肠杆菌、肠球菌和产气荚膜梭菌数量则明显低于模型对照组($p<0.01$) (表 6), 并接近正常对照组小鼠菌群数量。这说明中、高剂量的益生菌制剂可明显增殖双歧杆菌、乳杆菌, 抑制肠道有害菌群的异常增殖, 调整肠道菌群失调, 维持肠道平衡, 中剂量组对各菌群的调整作用程度好于低剂量组, 中、高剂量益生菌制剂对各菌群的调整作用程度无显著性差异。

益生菌剂治疗 14 d 后, 益生菌低剂量组肠道双歧杆菌、乳杆菌、肠杆菌、肠球菌和产气荚膜梭菌群数量分别为 7.68 ± 0.37 、 7.19 ± 0.28 、 6.93 ± 0.46 、 4.91 ± 1.01 和 5.89 ± 0.27 lg CFU/g, 益生菌中剂量组肠道双歧杆菌、乳杆菌、肠杆菌、肠球菌和产气荚膜梭菌群数量

分别为 7.82 ± 0.65 、 7.24 ± 0.63 、 6.82 ± 0.69 、 4.91 ± 0.81 和 5.66 ± 0.21 lg CFU/g, 益生菌高剂量组肠道双歧杆菌、乳杆菌、肠杆菌、肠球菌和产气荚膜梭菌群数量分别为 7.84 ± 0.39 、 7.27 ± 0.35 、 6.90 ± 0.77 、 4.82 ± 0.37 和 5.65 ± 0.88 lg CFU/g, 与正常对照组相当, 且与模型对照组存在显著性差异 (表 6), 这表明益生菌制剂对小鼠肠道菌群失调具有显著的调节作用, 能够恢复到正常水平。

2.5 腹泻模型小鼠肠道菌群的动态变化

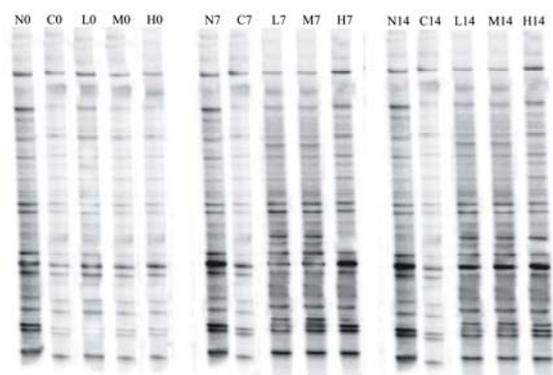


图 1 益生菌剂灌胃治疗期间腹泻小鼠肠道菌群 DGGE 图谱

Fig.1 DGGE atlas of intestinal flora in mice with diarrhea during lavage treatment with probiotic agents

注: N 表示正常对照组; C 表示腹泻模型对照组; L 表示低剂量治疗组; M 表示中剂量治疗组; H 表示高剂量治疗组; 0、7 和 14 分别表示菌剂治疗第 0、7、14 d, 如 N0 表示正常组第 0 d 样品。

采用变性梯度凝胶电泳技术对腹泻模型小鼠的益生菌制剂不同治疗期间的肠道菌群进行分析, 结果如

表 7 停用益生菌制剂后, 不同时期小鼠肠道中外源益生菌数量

Table 7 Number of exogenous probiotic bacteria in the intestinal tract of mice at different times after treatment with probiotic agent was stopped (lg copies/g feces)

组别	停用益生菌剂时间/d	外源益生菌		
		嗜酸乳杆菌 NCFM	乳双歧杆菌 Bi-07	鼠李糖乳杆菌 HN001
低剂量组	0	7.86 ± 0.04	7.41 ± 0.03	5.78 ± 0.03
	7	5.34 ± 0.03	5.06 ± 0.01	3.86 ± 0.02
	14	4.95 ± 0.05	4.71 ± 0.02	3.64 ± 0.02
中剂量组	0	7.73 ± 0.05	7.43 ± 0.02	5.89 ± 0.04
	7	5.39 ± 0.05	5.18 ± 0.04	4.04 ± 0.02
	14	5.08 ± 0.05	4.82 ± 0.04	3.78 ± 0.04
高剂量组	0	7.87 ± 0.02	7.47 ± 0.03	5.93 ± 0.02
	7	5.48 ± 0.01	5.17 ± 0.05	$4.16 \pm 0.03^*$
	14	5.13 ± 0.04	4.89 ± 0.03	$3.99 \pm 0.04^*$

注: 与低剂量组比较, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

图 1 所示。DGGE 电泳图条带的数量、位置及亮度能够反映出肠道菌群的多样性和丰度。由图 1 可见, 益生菌制剂灌胃治疗第 0 d 时, 与正常组相比, 对照组和各试验组的电泳条带数量和位置并无差异, 表明菌群多样性无显著性减少, 但电泳条带的亮度变弱, 表明各微生物丰度显著降低; 而对对照组和各试验组之间电泳条带亮度并无明显区别, 表明它们之间菌群多样性和各微生物的相对丰度均无显著差异, 这表明腹泻小鼠造模成功后, 其肠道微生物显著减少。随着益生菌制剂灌胃治疗的继续进行至第 7 d 时, 相比于对照组, 低、中、高剂量治疗组的电泳条带数量变多且相同位置的电泳条带亮度增强, 表明肠道微生物菌群多样性和各微生物丰度显著提升, 且剂量越高, 越接近正常试验组; 对照组的电泳条带数量变多和亮度增强, 表明微生物菌群有所恢复, 但恢复不显著, 与正常组和各治疗组均存在显著性差异。益生菌制剂灌胃治疗至第 14 d 时, 低、中、高剂量治疗组的电泳条带的数量、位置及条带的亮度均接近正常对照组, 表明肠道微生物菌群多样性和各微生物丰度均恢复至正常组相当水平, 说明益生菌剂对腹泻小鼠肠道菌群结构恢复具有显著作用, 有利于腹泻小鼠肠道正常菌群的重建。

2.6 外源益生菌在小鼠肠道中的存活情况

利用 qPCR 技术定量检测停用益生菌制剂后, 不同时期各组小鼠肠道中外源益生菌嗜酸乳杆菌 NCFM、乳双歧杆菌 Bi-07 和鼠李糖乳杆菌 HN001 的数量, 具体定量结果见表 7。

由表 7 的数据可以得知,灌胃益生菌制剂治疗 14 d 后,低剂量治疗组的小鼠粪便中嗜酸乳杆菌 NCFM、乳双歧杆菌 Bi-07 和鼠李糖乳杆菌 HN001 分别达到 7.86 ± 0.04 、 7.41 ± 0.03 和 5.78 ± 0.03 Lg copies/g; 中剂量治疗组的小鼠粪便中嗜酸乳杆菌 NCFM、乳双歧杆菌 Bi-07 和鼠李糖乳杆菌 HN001 分别达到 7.73 ± 0.05 、 7.43 ± 0.02 和 5.89 ± 0.04 Lg copies/g; 高剂量治疗组的小鼠粪便中嗜酸乳杆菌 NCFM、乳双歧杆菌 Bi-07 和鼠李糖乳杆菌 HN001 分别达到 7.87 ± 0.02 、 7.47 ± 0.03 和 5.93 ± 0.02 Lg copies/g; 低中高剂量治疗组小鼠肠道中三种外源益生菌数量之间无显著差异。由此可见,益生菌制剂灌胃治疗腹泻小鼠 14 d 后,其用量对小鼠肠道益生菌定殖无显著影响。当停止灌胃益生菌剂 7 d 时,粪便中嗜酸乳杆菌 NCFM、乳双歧杆菌 Bi-07 和鼠李糖乳杆菌 HN001 的菌数均有显著下降,低剂量治疗组下降至 5.34 ± 0.03 、 5.06 ± 0.01 和 3.86 ± 0.02 Lg copies/g; 中剂量治疗组分别下降至 5.39 ± 0.05 、 5.18 ± 0.04 和 4.04 ± 0.02 Lg copies/g; 高量治疗组分别下降至 5.48 ± 0.01 、 5.17 ± 0.05 和 4.16 ± 0.03 Lg copies/g; 各组间无显著性差异 ($p > 0.01$)。当停止灌胃益生菌制剂 14 d 时,粪便中嗜酸乳杆菌 NCFM、乳双歧杆菌 Bi-07 和鼠李糖乳杆菌 HN001 的菌数均进一步下降,但下降幅度不大,无显著性差异。因此,外源益生菌嗜酸乳杆菌 NCFM、乳双歧杆菌 Bi-07 和鼠李糖乳杆菌 HN001 在停止灌胃后,均能在小鼠肠道内定殖存活,但停用 7 d 后,益生菌均有显著性下降,随后下降速度变慢,停用 14 d 后,外源益生菌嗜酸乳杆菌 NCFM、乳双歧杆菌 Bi-07 和鼠李糖乳杆菌 HN001 均下降约 30~40%之间,且不同剂量各组间均无显著性差异。

3 讨论

3.1 胃肠道中存在大量的微生物,是人体重要的生物屏障,但是肠道菌群容易受外因和内因的影响造成菌群失调,其中抗生素就是主要的原因之一。本研究采用氨苄青霉素构建腹泻模型,造模时间为一周。在同等剂量抗生素下,郭云霞等^[11]造模时间是 3 d。分析造模时间的差异可能是小鼠个体的不同,环境温度不同等因素引起的。

3.2 研究资料表明,益生菌不仅能够抑制肠道有害菌的增值,促进有益菌的增值,有效恢复和维持肠道菌群平衡,肠道菌群还参与人体的免疫调节,提高人体免疫力,这些作用有助于预防和治疗抗生素引起的腹泻^[12]。抗生素诱导腹泻造模成功后,采用平板计数法测量肠道菌群发现乳杆菌和双歧杆菌的数量下降,肠

杆菌、肠球菌和产气荚膜梭菌的数量上升,小鼠肠道菌群平衡被打破。利用益生菌制剂治疗 14 d 后,三个剂量组小鼠的稀便率、稀便级和腹泻指数具有不同程度的下降,与模型组比较差异显著 ($p < 0.01$),表明小鼠的腹泻状况有较好的改善;采用平板计数法测量给药治疗 0、7、14 d 的小鼠粪便双歧杆菌、乳杆菌、肠杆菌、肠球菌和产气荚膜梭菌发现,给药 7 d 后,三个剂量组的肠道菌群数量与模型对照组均有显著性差异 ($p < 0.01$),但仍低于正常对照组,给药 14 d 后,三个剂量组的肠道菌群数量恢复至正常对照组水平,说明小鼠的肠道菌群恢复了原有的平衡,且乳杆菌和双歧杆菌数量增加,这与郭云霞等^[11]的研究一致。DGGE 技术检测小鼠的肠道菌群结构发现,给药 7 d,各剂量组的肠道菌群具有不同程度的恢复,但并不显著,给药 14 d 后,三个剂量组则基本恢复至正常对照组水平。因此该益生菌制剂能够改善抗生素诱导的小鼠腹泻,调节肠道菌群。

3.3 益生菌作为肠道内重要菌群,近年来国内外的研究有很多,如 walker^[13]的关于益生菌对肠道免疫系统的研究;Gregor Reid^[14]益生菌在治疗腹泻疾病的研究;黄小琼^[8]等用益生菌对肠道菌群的恢复研究。但在现有的文献中,益生菌对肠道菌群的调节研究都是采用传统的平板计数法测定肠道菌群的数量变化。该方法操作较简单,成本低,但不能真实地反映生物体内肠道菌群准确的数目。本研究综合运用生物分子技术和传统培养法,在传统平板计数法的基础上综合采用 DGGE、荧光定量 PCR 等技术来研究。用 DGGE 技术将益生菌制剂恢复后的肠道菌群结构与正常小鼠的肠道菌群结构对比,弥补传统培养法的不足;而荧光定量 PCR 能够准确追踪外源益生菌在生物体内的定殖存活状况,在停止服用益生菌制剂 14 d 后,仍可检测到外源性益生菌外源益生菌,但三个菌株均下降 30~40%,表明外源益生菌能够在肠道进行定植,但随着时间的推移呈衰减的趋势,需持续补充益生菌维持其数量。

3.4 益生菌的作用依赖于菌株的特异性,不同的菌株具有不同的功效。本研究的益生菌制剂中含有的嗜酸乳杆菌 NCFM 经临床研究证实,具有调节免疫,改善肠炎,降低胆固醇,改善乳糖的耐受性,恢复抗生素导致的肠道菌群失调,抑制肠道病原菌等作用^[15-18]。乳双歧杆菌 Bi-07 经临床研究证实具有促进肠道健康、改善腹泻和便秘、调节免疫等作用^[15,16,19,20]。鼠李糖杆菌 HN001 则具有调节免疫、抑制病原菌和缓解过敏性湿疹等作用,而且定植于肠道中的 HN001 还能够促进其他益生菌的增殖^[21-23]。正是由于这三株

菌的特定功效作用,才使得该益生菌制剂能够发挥调节肠菌群,治疗和改善腹泻的作用。

3.5 另外,沈志华等研究发现抗生素相关腹泻的患者中,脾虚型所占比重最大^[24]。益生菌制剂成份中的山药和山楂具有健运脾胃的功效,亦有助于小鼠腹泻的恢复。山药,甘、平。补脾养胃,生津益肺,可用于脾虚食少,泄泻便溏;山楂,酸、甘,微温。有消食健胃,行气散瘀,泻痢腹痛之功,可用于肉食积滞,泻痢不爽。益生菌制剂中的菊粉作为一种优良的益生元不仅能够促进有益菌的增殖,抑制有害菌生长,还具有改善腹泻的功效。因而该制剂中的山楂、山药和菊粉也有助于改善和治疗腹泻。

参考文献

- [1] 孙芝兰.卷曲乳杆菌益生特性及黏附机理研究[D].济南:山东大学,2012
SUN Zhi-lan. Studies on the probiotic properties and adhesion mechanisms of *Lactobacillus Cripatus* [D]. Ji'nan: Shandong University, 2012
- [2] 杨吉雨.植物源添加剂对益生菌生长的影响和益生菌微生态制剂的开发[D].长春:吉林大学,2015
YANG Ji-yu. The influence of plant source additives on the growth of probiotics and the development of probiotics preparations [D]. Changchun: Jilin University, 2015
- [3] 李旻.人体肠道菌群结构与宿主代谢的相关性研究[D].上海:上海交通大学,2009
LI Min. Co-variation analysis of human gut microbial structure and host global metabolism [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2009
- [4] ZHAO Li-ping, SHEN Jian. Whole-body systems approaches for gut microbiota-targeted, preventive healthcare [J]. Journal of Biotechnology, 2010, 149(3): 183-188
- [5] Bisson J F, Hidalgo S, Rozan P, et al. Preventive effects of different probiotic formulations on travelers' diarrhea model in wistar rats [J]. Digestive Diseases and Sciences, 2010, 55(4): 911-919
- [6] TIAN Peng, XU Bo, SUN Han-xiao, et al. Isolation and gut microbiota modulation of antibiotic-resistant probiotics from human feces [J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2014, 79(4): 405-412
- [7] Andrade V A, Jardim C A, Melo F M, et al. Nucleoplasmic calcium regulates proliferation of hepatocytes through legumain and reticulon4 [J]. Journal of Hepatology, 2009, 136(5): 792
- [8] 黄小琼,刘盛来,郑佳林,等.合生元益生菌冲剂对小鼠肠道菌群调节作用的研究[J].中国比较医学杂志,2011,21(Z1): 127-130
HUANG Xiao-qiong, LIU Sheng-lai, ZHENG Jia-lin, et al. The effect of BIOSTIME probiotics on mouse normal intestinal microflora [J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2011, 21(Z1): 127-130
- [9] Engelbrektsen A, Korzenik J R, Pittler A, et al. Probiotics to minimize the disruption of faecal microbiota in healthy subjects undergoing antibiotic therapy [J]. Journal of Medical Microbiology, 2009, 58(5): 663-670
- [10] Pérez-Cobas A, Gosalbes M J, Friedrichs A, et al. Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach [J]. Gut, 2013, 62(11): 1591-1601
- [11] 郭云霞,尹艳军,郝庆红,等.益生菌与黄芪提取液联合对腹泻模型小鼠肠道功能的影响[J].中国兽医杂志,2015,51(7): 30-32,50
GUO Yun-xia, YIN Yan-jun, HAO Qing-hong, et al. Effects of astragali radix extraction and probiotics synergy on intestinal function of diarrhea mouse model [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2015, 51(7): 30-32, 50
- [12] 郭慧玲,邵玉宇,孟和毕力格,等.肠道菌群与疾病关系的研究进展[J].微生物学通报,2015,42(2):400-410
GUO Hui-ling, SHAO Yu-yu, MENGHE Bi-lige, et al. Research on the relation between gastrointestinal microbiota and disease [J]. Microbiology China, 2015, 42(2): 400-410
- [13] Walker W A, Goulet O, Morelli L, et al. Progress in the science of probiotics: from cellular microbiology and applied immunology to clinical nutrition [J]. European Journal of Nutrition, 2006, 45: 1-18
- [14] Reid G. Probiotics in the treatment of diarrheal diseases [J]. Current Infectious Disease Reports, 2000, 2(1): 78-83
- [15] Engelbrektsen A, Korzenik J R, Pittler A, et al. Probiotics to minimize the disruption of faecal microbiota in healthy subjects undergoing antibiotic therapy [J]. Journal of Medical Microbiology, 2009, 58(Pt 5): 663-70
- [16] Paineau D, Carcano D, Leyer G, et al. Effects of seven potential probiotic strains on specific immune responses in healthy adults: a double-blind, randomized, controlled trial [J]. Fems Immunology & Medical Microbiology, 2008, 53(1): 107-113
- [17] Thompson L U, Jenkins D J, Amer M A, et al. The effect of fermented and unfermented milks on serum cholesterol [J]. American Journal of Clinical Nutrition, 1982, 36(6): 1106-1111
- [18] McDonough F E, Hitchins A D, Wong N P, et al. Modification

- of sweet acidophilus milk to improve utilization by lactose-intolerant persons [J]. American Journal of Clinical Nutrition, 1987, 45(3): 570-574
- [19] Martin F A, Belinchón P P, Costa C M, et al. Effect of oral nutritional supplementation with or without synbiotics on sickness and catch-up growth in preschool children [J]. International Pediatrics, 2002, 4: 216
- [20] Ringel Y, Palsson O S, Leyer G, et al. T1406 probiotic bacteria *Lactobacillus Acidophilus Ncfm* and *Bifidobacterium Lactis* Bi07 improve symptoms of bloating in patients with functional bowel disorders (FBD) [J]. Gastroenterology, 2008, 134(4): A-549
- [21] Sistik D, Kelly R, Wickens K, et al. Is the effect of probiotics on atopic dermatitis confined to food sensitized children? [J]. Clinical & Experimental Allergy, 2006, 36(5): 629-633
- [22] Gill H S, Cross M L, Rutherford K J, et al. Dietary probiotic supplementation to enhance cellular immunity in the elderly [J]. British Journal of Biomedical Science, 2001, 58(2): 94-6
- [23] Tannock G W, Munro K, Harmsen H J M, et al. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20 [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2000, 66(6): 2578-2588
- [24] 沈志华,王萍,舒青龙.中医药治疗抗生素相关性脾虚型腹泻 53 例疗效分析[J].江西中医药大学学报,2013,25(2):34-36
- SHEN Zhi-hua, WANG ping, SHU Qing-long. Therapeutic effect observation on 53 cases of splenasthenic syndrome related therapeutic effect observation on 53 cases of splenasthenic syndrome related to antibiotic-associated diarrhea by syndrome differentiation and treatment [J]. Journal of Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, 2013, 25(2): 34-36