

体外发酵条件下嗜热链球菌 S131 对肠道健康的调控机制

贾晓蒙, 李思童, 路江浩, 贾洪利, 郭红敏, 霍文敏, 杨玲*

(河北一然生物科技股份有限公司研发中心, 河北石家庄 050000)

摘要: 该研究以 HT-29 细胞与人体肠道菌群批量发酵模拟系统相结合, 探究嗜热链球菌 S131 对肠道屏障的影响、拮抗致病菌造成的肠道损伤及对有益菌的增殖效果。结果表明, 与对照组相比 S131 使 HT-29 细胞黏蛋白 MUC2、紧密连接蛋白 ZO-1、ZO-2、Claudin-1 与 Occludin mRNA 相对表达分别提升至 1.34、4.59、2.17、5.81 和 4.25, 同时能够缓解产肠毒素性大肠杆菌 (*Enterotoxigenic E. coli*, ETEC) 对相应基因表达的抑制, 各基因分别提升至 1.42、6.28、3.27、5.03 和 4.79。S131 对 ETEC 造成的 HT-29 细胞炎症因子分泌增加具有显著抑制作用, 使 IL-8 和 IL-1 β 分别由 821.79 pg/mL 和 2.22 pg/mL 降至 573.92 pg/mL 和 0.29 pg/mL。S131 改善了 ETEC 造成的上皮细胞损伤, 将细胞增殖率提升至 21.07%。同时 S131 缓解了 ETEC 造成的 *AQP-3* mRNA 相对表达下调, 使 *AQP-3* 基因表达提升至 1.21。并且通过 qPCR 检测发现 S131 提升了体外发酵体系中柔嫩梭菌属 (*Faecalibacterium*) 和多形拟杆菌属 (*Bacteroides thetaiotaomicron*) 的相对丰度, 改善了 ETEC 造成的乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、多形拟杆菌和柔嫩梭菌属的降低。综上, 嗜热链球菌 S131 可能通过增强肠道屏障、拮抗致病菌损伤和调节肠道菌群来改善肠道健康。

关键词: 嗜热链球菌; 产肠毒素大肠杆菌 (*Enterotoxigenic E. coli*, ETEC); 肠道屏障; 炎症因子; 肠道菌群

文章编号: 1673-9078(2023)11-41-47

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.11.1449

Mechanistic Insights into *Streptococcus thermophilus* S131 Impact on Intestinal Health via *in Vitro* Fermentation Studies

JIA Xiaomeng, LI Sitong, LU Jianghao, JIA Hongli, GUO Hongmin, HUO Wenmin, YANG Ling*

(R & D Center, Hebei Inatural Biotech Co. Ltd., Shijiazhuang 050000, China)

Abstract: Using HT-29 cells in combination with a batch fermentation system that simulates human intestinal flora metabolism, the effects of *Streptococcus thermophilus* S131 on the intestinal barrier, including mitigation of pathogen-induced intestinal damage, and its role in promoting the growth of beneficial bacteria were assessed. Compared to control fermentations, cultures with *S. thermophilus* S131 increased mucin (MUC2) relative mRNA levels 1.34 fold, and respective tight junction protein (ZO-1, ZO-2, claudin-1, and occludin) levels 4.59, 2.17, 5.81, and 4.25 fold. Inclusion of *S. thermophilus* S131 also ameliorated downregulation of these genes by enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), increasing respective expression levels 1.42, 6.28, 3.27, 5.03, and 4.79 fold relative to cultures exposed to ETEC alone. *S. thermophilus* S131 significantly suppressed ETEC-mediated increased inflammatory factor secretion by HT-29 cells, reducing IL-8 and IL-1 β levels from 821.79 and 2.22 pg/mL to 573.92 and 0.29 pg/mL, respectively. It also ameliorated ETEC-induced epithelial cell damage, increasing the cell proliferation rate by 21.07%. *S. thermophilus* S131 also alleviated ETEC suppression of *AQP-3* mRNA expression by 21%. qPCR assays revealed that *S. thermophilus* S131 increased the relative abundance of *Faecalibacterium* and *Bacteroides thetaiotaomicron* in our *in vitro* fermentation system, rescuing ETEC mediated suppression of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, and

引文格式:

贾晓蒙,李思童,路江浩,等.体外发酵条件下嗜热链球菌 S131 对肠道健康的调控机制[J].现代食品科技,2023,39(11):41-47

JIA Xiaomeng, LI Sitong, LU Jianghao, et al. Mechanistic insights into *Streptococcus thermophilus* S131 impact on intestinal health via *in Vitro* fermentation studies [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(11): 41-47

收稿日期: 2022-11-15

基金项目: 石家庄市高层次科技创新创业人才 (06202103)

作者简介: 贾晓蒙 (1992-), 男, 硕士研究生, 工程师, 研究方向: 益生菌与人体健康, E-mail: jiaxm2018@163.com

通讯作者: 杨玲 (1984-), 女, 高级工程师, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: Yiting2268@163.com

Faecalibacterium. In conclusion, *S. thermophilus* S131 may promote intestinal health by strengthening the intestinal barrier, antagonizing pathogen-induced damage, and regulating the intestinal flora.

Key words: *Streptococcus thermophilus*; enterotoxigenic *Escherichia coli*; intestinal barrier; inflammatory factors; intestinal flora

益生菌是指足量摄入时能够对宿主产生健康益处的活性微生物,其定植于肠道可以分泌大量的代谢产物,调节肠道微生态平衡,从而增强机体肠道屏障并调节肠道免疫使机体受益^[1-3]。通过补充益生菌改善肠道微生态来治疗胃肠道疾病的疗法已成为近年来的研究热点,如 Wang 等^[4]研究发现两歧双歧杆菌 CCFM16 可以通过调节肠道微生物群和短链脂肪酸代谢缓解中国成年人的慢性便秘;臧凯丽等^[5]研究发现补充益生菌能够改善便秘和腹泻人群的肠道菌群结构及相关症状,提高菌群多样性和短链脂肪酸水平;补充益生菌能够减少成人的抗生素腹泻持续时间,帮助恢复营养不良儿童的肠道菌群结构并减少腹泻的发生^[6-9]。Nobutani 等^[10]发现,干酪乳杆菌 CP2305 能够显著改善肠易激综合征 (Irritable Bowel Syndrome, IBS) 的严重性指数评分。Palumbo 等^[11]研究发现益生菌混合与药物联合使用能够提高溃疡性结肠炎 (Ulcerative Colitis, UC) 患者的治疗效果。

目前人们对益生菌的研究大多集中于双歧杆菌属及乳杆菌属,而对嗜热链球菌在改善肠道健康中的应用鲜有研究^[12]。为明确嗜热链球菌在调节肠道健康中的作用机制,本研究选用 HT-29 细胞结合肠道菌群体外批量发酵模拟系统,考察了嗜热链球菌 S131 在特异性调控粘蛋白和紧密连接蛋白基因表达水平,调节免疫因子分泌,增殖肠道有益菌,并拮抗产肠毒素大肠杆菌 (Enterotoxigenic *E. coli*, ETEC) 造成的肠道损伤等方面的作用,为开发具有肠道调节功能的嗜热链球菌产品提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

嗜热链球菌 S131 河北一然生物科技股份有限公司保藏; HT-29 细胞 (人结肠癌细胞) 武汉普诺赛生命科技有限公司。

胎牛血清、HT-29 细胞培养基、McCoy's 5A 培养基、胰蛋白酶、PBS 缓冲液,武汉普诺赛生命科技有限公司; 细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒、FastKing cDNA 第一链合成试剂盒、SuperReal 荧光定量预混试剂增强版 (SYBR Green) 试剂盒,天根生化科技有限公司; IL-8、IL-1 β 酶联免疫吸附测定试剂盒,四正柏生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

Mini 细胞计数仪,美国 nexcelom 公司; Multiskan Sky 酶标仪、Fresco21 型高速离心机,赛默飞世尔科技公司; CKX41 倒置显微镜,日本奥林巴斯公司; DH-160HI 二氧化碳培养箱、LRH-250F 生化培养箱,昆山一恒仪器有限公司; 9700 型 PCR 扩增仪,杭州博日科技有限公司; LM2012 实时荧光 PCR 分析仪,上海复星医学检测设备有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 HT-29 细胞的培养

将在 -80 °C 超低温冰箱中保存的 HT-29 细胞取出,37 °C 恒温水浴迅速解冻复苏,培养瓶中加入一定量的 HT-29 细胞完全培养基, $\rho=5\%$ CO₂ 培养箱中 37 °C 培养 24 h 至细胞长满培养瓶底面积 80% 后,将其用胰蛋白酶消化处理转移至大号培养瓶中连续传代 3 次进行实验。

1.3.2 S131 及 ETEC 的培养

嗜热链球菌 S131 及 ETEC 以 3% (V/V) 的接种量接种于 MRS 汤培养基中,37 °C 恒温培养箱中培养,连续传代 3 次,其中第 3 代培养 18 h 以恢复菌种活力后调整菌液浓度。3 代菌种 4 °C 5 000 r/min 离心 5 min,收集菌体用 PBS 洗涤 2 次,4 °C 5 000 r/min 离心 5 min 后,去除上清,用 McCoy's 5A 培养基重悬,利用细胞计数仪调整 S131 及 ETEC 菌体浓度均为 10⁸ CFU/mL,备用。

1.3.3 体外发酵系统

表 1 体外发酵过程中各分组接种方式

Table 1 Inoculation methods of each group during *in vitro* fermentation

分组	接种方法
对照组 (Control)	仅接种粪菌悬液培养 24 h
ETEC 组 (ETEC)	接种粪菌悬液后接种等量的 ETEC 菌悬液培养 24 h
干预组 (S131)	接种粪菌悬液后接种等量的 S131 菌悬液培养 24 h
治疗组 (E+S131)	接种粪菌悬液后接种等量的 ETEC 菌悬液培养 12 h, 然后接种等量的 S131 菌悬液培养 12 h

体外发酵系统中基础培养基 (YCFA) 参考陈军奎等^[13]研究配置好后 pH 调节到 6.5, 然后于厌氧条件下在 10 mL 的西林瓶中分装 5 mL 培养基, 密封后高压灭菌。

取正常人新鲜粪使用生理盐水按照 1:10 比例稀释过滤得到粪菌悬液, 取 500 μ L 处理好的新鲜粪菌悬液接种到 YCFA 培养基中后, 按照表 2 分组接种 ETEC 及嗜热链球菌 S131, 于 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后将发酵液于 9 000 r/min 离心 3 min, 取沉淀进行菌群检测, 上清液 0.22 μ m 膜过滤后与 HT-29 细胞共培养。

1.3.4 CCK-8 细胞增殖能力测定

HT-29 细胞培养至 3 代后将细胞浓度调整为每毫升 2×10^5 个, 每孔 100 μ L 细胞液接于 96 孔板中, 培养 16~20 h 细胞贴壁后, 更换新鲜培养液, 每孔接种该分组发酵上清液 10 μ L 于 96 孔板, 接种 10 μ L 细胞培养液为空白组, 置于 5% CO₂ 培养箱中 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h 后参考 CCK-8 试剂盒说明书检测细胞增殖情况: 每孔内加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液, 细胞培养箱内孵育 1 h, 在 450 nm 波长下测定 OD 值。计算细胞相对增殖率。

$$B = \frac{As - Ac}{Ac} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

B ——细胞相对增殖率, %;

As ——实验组 OD 值;

Ac ——空白对照组 OD 值。

1.3.5 发酵上清液与 HT-29 细胞共培养

HT-29 细胞培养至 3 代后将细胞浓度调整为每毫升 2×10^5 个, 每孔 2 mL 细胞液接于 24 孔板中, 培养 16~20 h 细胞贴壁后, 更换 2 mL 新鲜培养液。对照组、ETEC 组、干预组及治疗组分别每孔接种该分组发酵上清液 200 μ L 于 24 孔板, 接种 200 μ L 细胞培养液为空白组, 置于 5% CO₂ 培养箱中 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h 后分别收集细胞及上清液, -80 $^{\circ}$ C 冰箱储存待用。

1.3.6 实时荧光定量 PCR 分析

共培养后 HT-29 细胞按照 RNA Easy Fast 动物组织/细胞 RNA 提取试剂盒 (离心柱型) 操作说明提取细胞 RNA, 并通过 Fast King cDNA 第一链合成试剂盒操作说明反转录为 cDNA, 并在 -80 $^{\circ}$ C 保存。使用 Super Real 荧光定量预混试剂增强版 (SYBR Green) 试剂盒进行实时 PCR, 分析粘蛋白基因 (*MUC2*)、水通道蛋白-3 基因 (*AQP-3*)、紧密连接蛋白基因 (*ZO-1*、*ZO-2*、*Claudin-1*、*Occludin*) 表达水平, RT-PCR 引物序列见表 2。

参照 SYBR Green 试剂盒说明书要求进行加样。加样后进行 RT-qPCR 扩增反应扩增参数参考张秋月

等^[14]并加以修改: 95 $^{\circ}$ C、15 s, 60 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、30 s, 循环 45 次。溶解曲线分析步骤为 65 $^{\circ}$ C~95 $^{\circ}$ C, 每步升 0.5 $^{\circ}$ C, 保持 5 s。以 β -actin 基因为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各实验组相对于对照组各基因的相对表达量。

表 2 RT-PCR 引物序列

Table 2 Primer sequences of RT-PCR

引物	引物序列 (5'-3')
β -actin	F: 5'-TTTTAGGATGGCAAGGGACTT-3'
	R: 5'-GATGAGTTGGCATGGCTTTA-3'
<i>MUC2</i>	F: 5'-GACCCGCACTATGTCACCTT-3'
	R: 5'-GGACAGGACACCTTGTCGTT-3'
<i>AQP-3</i>	F: 5'-AGACAGCCCCTTCAGGATT-3'
	R: 5'-TCCCTTGCCCTGAATATCTG-3'
<i>Claudin-1</i>	F: 5'-AAGTGCTTGAAGACGATGA-3'
	R: 5'-CTTGGTGTGGGTAAGAGGTT-3'
<i>ZO-1</i>	F: 5'-ATCCCTCAAGGAGCCATTC-3'
	R: 5'-CACTTGTTTGGCAGGTTTAA-3'
<i>Occludin</i>	F: 5'-CCAATGTCGAGGAGTGGG-3'
	R: 5'-CGCTGCTGTAACGAGGCT-3'
<i>ZO-2</i>	F: 5'-AAAGCAGAGCGAACGAAGAG-3'
	R: 5'-TTTAGTTGCCAGACCCGTTTC-3'

1.3.7 ELISA 测定 HT-29 细胞免疫因子质量浓度

共培养后将收集的细胞培养液离心取上清分装至无酶 PE 管中, 按照 ELISA 试剂盒说明书梯度稀释 IL-8、IL-1 β 标准品及相关操作, 细胞培养基作为空白孔, 反应结束后迅速用酶标仪测定各反应孔在 450 nm 波长下的 OD 值, 根据标准曲线计算细胞因子质量浓度。

1.3.8 肠道菌群检测

收集发酵液离心取沉淀, 参考杨玲等^[15]研究用磁珠法提取沉淀中微生物的总 DNA 并进行 qPCR 检测, 由河北一然生物科技股份有限公司 MAP 肠道检测平台进行检测。

1.3.9 数据分析

所有实验均设置 3 组平行, 数据以 Mean \pm SD 表示。采用 Origin 软件绘图, 采用 Excel 2016、SPSS 23.0 软件对数据进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 嗜热链球菌 S131 对 HT-29 细胞黏蛋白表达的影响

肠道中的杯状细胞能够分泌黏蛋白形成一层黏液屏障, 黏液屏障能够覆盖在肠道上皮细胞表面从而保

护肠道上皮细胞免受病原菌和有毒有害物质的侵袭，同时粘液屏障也是肠道的润滑剂，黏液层的完整性对肠上皮细胞保护及肠道转运过程是至关重要的^[8,16,17]。II型黏蛋白(MUC2)是典型的分泌型黏蛋白，存在于小肠和大肠中，能够形成粘液骨架，是肠道粘液的主要成分^[18]。研究表明，与对照组相比，S131使HT-29细胞MUC2的mRNA相对表达水平提升至1.34倍，同时ETEC下调MUC2基因的表达水平至0.75倍，而S131的干预能够改善ETEC对MUC2基因表达的抑制效果，使其恢复至正常水平还略有升高。表明S131能够增加肠道的粘液分泌，缓解ETEC感染造成的粘液屏障损伤。

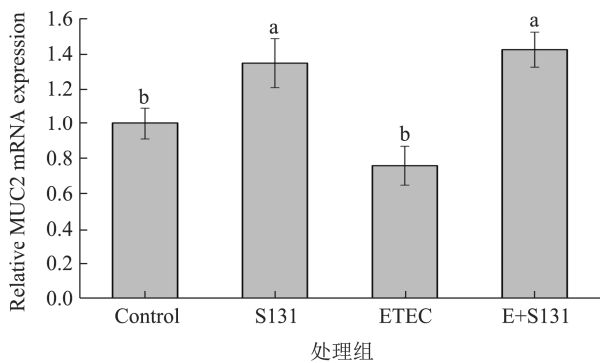


图1 嗜热链球菌 S131 对 HT-29 细胞黏蛋白表达的影响

Fig.1 Effect of *Streptococcus thermophilus* S131 on mucin expression in HT-29 cells

注：同一指标不同字母表示差异性显著 ($P < 0.05$)，下同。

2.2 嗜热链球菌 S131 对 HT-29 细胞紧密连接蛋白表达的影响

肠上皮组织结构的完整性和细胞的生长能力，是有效避免肠道细菌或其他物质透过肠粘膜进入其他组织的基础^[17,19]。肠上皮细胞之间既能够形成结构复杂、孔径较小的紧密连接结构，也可以形成结构层次简单、孔径较大的紧密连接结构，选择性的透过小分子量或大分子量分子^[20]。研究表明，益生菌能够使体外培养的肠上皮细胞紧密连接相关蛋白上调表达、改变紧密连接蛋白在胞内的分布^[21]。同时肠道内双歧杆菌、乳杆菌分泌的短链脂肪酸能够起到维持肠黏膜上皮细胞紧密连接的作用，从而保护肠道机械屏障^[22]。与对照组相比，S131 的刺激显著上调了 HT-29 细胞紧密连接蛋白基因的表达水平，ZO-1、ZO-2、Claudin-1 与 Occludin 的 mRNA 相对表达率分别为 4.59、2.17、5.81 和 4.25，而 ETEC 使 HT-29 细胞 ZO-2 的 mRNA 相对表达率下调至 0.63，同时上调了 ZO-1 的相对表达率至 1.39，未发现 ETEC 对 Claudin-1 和 Occludin 基因

表达的显著影响。但 S131 的干预能够在 ETEC 存在的情况下上调各紧密连接蛋白的相对表达。与张中伟、Sawada 等^[23,24]研究发现致病菌能够通过改变紧密连接蛋白结构与功能、破坏细胞骨架结构等方式影响肠道屏障功能的结果略有差异，本研究显示 S131 能够上调 HT-29 细胞紧密连接蛋白的基因表达，但 ETEC 对其表达的抑制效果并不明显，ETEC 对肠道机械屏障的破坏可能是通过其它机制造成的。

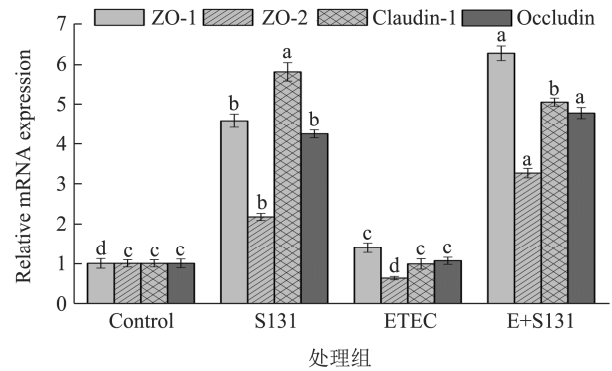


图2 嗜热链球菌 S131 对 HT-29 细胞紧密连接蛋白表达的影响

Fig.2 Effect of *Streptococcus thermophilus* S131 on tight junction protein expression in HT-29 cells

2.3 嗜热链球菌 S131 拮抗 ETEC 引起的 HT-29 细胞炎症因子表达

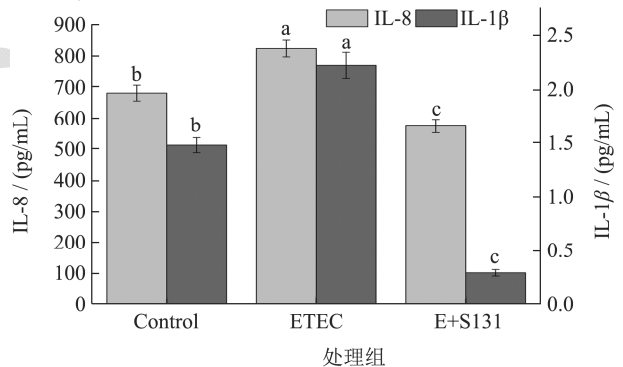


图3 嗜热链球菌 S131 拮抗 ETEC 引起的 HT-29 细胞炎症因子表达

Fig.3 *Streptococcus thermophilus* S131 antagonizes the expression of inflammatory factors in HT-29 cells induced by ETEC

大量研究表明，ETEC 能够影响肠道屏障的通透性、破坏免疫稳态，从而引起肠道炎症，最终损害肠道健康^[25,26]。抗生素则被认为是最有效的抗菌药物，而抗生素的副作用及耐药菌的出现使得人们对新的干预方式产生了极大兴趣^[27,28]。郭远骥等^[29]与 Candela 等^[30]研究发现乳杆菌属能够有效抑制 ETEC 刺激 HT-29 细胞产生炎症因子。大量动物实验也表明，益生菌能够

降低仔猪或小鼠体内炎症因子水平，从而降低炎症反应^[31-33]。与先前研究结果相似，我们的研究结果显示，ETEC 组促炎因子 IL-8 及 IL-1 β 浓度与对照组差异显著，相较于对照组分别增加了 20.82%和 50.05%，表现出较高的促炎作用；接种 S131 后，IL-8 与 IL-1 β 浓度相较于 ETEC 组分别下降了 30.16%和 86.82%，相较于对照组分别下降了 15.62%和 80.22%，表明 S131 能够抑制 ETEC 刺激 HT-29 细胞产生的促炎因子 IL-8 与 IL-1 β ，从而抑制炎症发生、提高肠道免疫力。

2.4 嗜热链球菌 S131 对 HT-29 细胞水通道蛋白-3 表达的影响

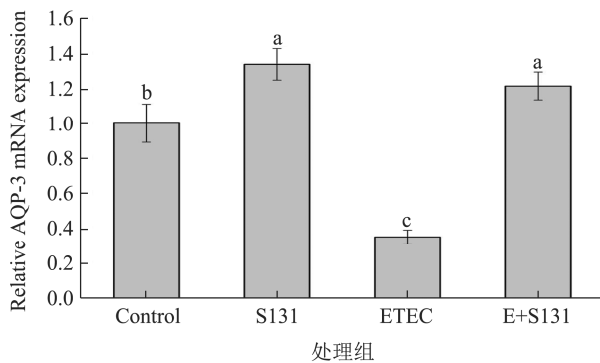


图4 嗜热链球菌 S131 对 HT-29 细胞水通道蛋白-3 表达的影响
Fig.4 Effect of *Streptococcus thermophilus* S131 on aquaporin-3 expression in HT-29 cells

水通道蛋白 (Aquaporins, AQPs) 是位于细胞膜上的蛋白质，能够调节水在细胞中的转运，哺乳动物中已发现 10 种不同的水通道蛋白亚型^[34,35]。其中水通道蛋白-3 (AQP-3) 是介导人体结肠水液代谢的关键因子之一，其表达可受多种因素的影响，有研究表明可以通过调节 AQP-3 的表达来控制结肠对水液的吸收速率，从而改善便秘或者腹泻症状^[36]。由图可知与对照相比 S131 能够使 HT-29 细胞 AQP-3 基因表达率提高至 1.33 倍，ETEC 使 HT-29 细胞 AQP-3 基因相对表达率下调至 0.34，而 S131 的干预能够改善 ETEC 造成的 AQP-3 表达下调。虽然 ETEC 引起腹泻的水外流机制尚未明确，但其可能与 AQP-3 表达下调有关，而 S131 可能通过恢复 AQP-3 的表达改善 ETEC 造成的腹泻，这与 Wu 等^[37,38]研究发现鼠李糖乳杆菌 LB1 改善 ETEC 引起仔猪腹泻的机制相似。

2.5 嗜热链球菌 S131 拮抗 ETEC 造成的 HT-29 细胞损伤

肠黏膜包括单层的上皮细胞、固定上皮细胞的结

缔组织和黏膜平滑肌共三层不同的结构。肠上皮细胞的完整性对吸收营养物质、阻挡致病菌和内毒素的入侵至关重要^[39]。多项研究表明 ETEC 具有的毒力基因能够通过破坏细胞骨架、引起炎症反应多种机制对宿主的肠道上皮细胞造成损伤^[40,41]。我们的研究表明 ETEC 能够降低 HT-29 细胞的存活率，与对照相比 ETEC 组的细胞增殖率降低了 2.06%，而 S131 的干预能够使 HT-29 细胞的增殖率提高 21.07%，表明 S131 能够清除 ETEC 产生的毒素类物质，并产生有益于肠上皮细胞生长的物质，从而拮抗 ETEC 对肠上皮细胞的损伤。

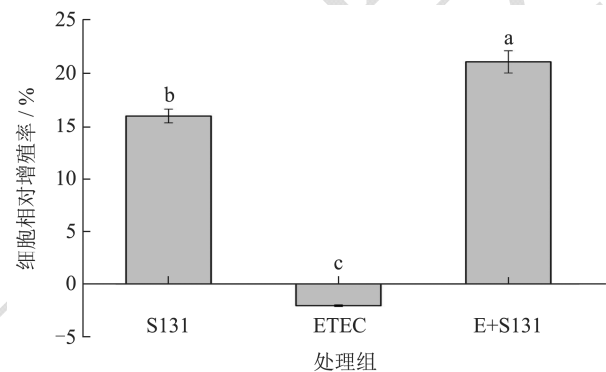


图5 嗜热链球菌 S131 拮抗 ETEC 造成的 HT-29 细胞损伤
Fig.5 HT-29 cell damage caused by ETEC antagonism by *Streptococcus thermophilus* S131

2.6 嗜热链球菌 S131 对肠道有益菌的影响

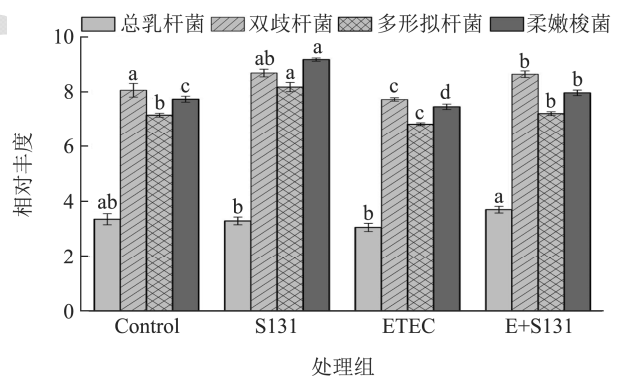


图6 嗜热链球菌 S131 对肠道有益菌的影响

Fig.6 Effect of *Streptococcus thermophilus* S131 on beneficial bacteria in intestinal tract

乳杆菌和双歧杆菌是公认的有益菌，能够通过多种机制改善肠道健康。柔嫩梭菌 (*Faecalibacterium*) 是肠道中主要的丁酸产生菌之一，能够起到维持肠道稳态和抗炎的作用，研究表明患有消化系统疾病的患者，如慢性便秘、乳糜泻、IBS 及 IBD 患者中的柔嫩梭菌丰度低于平均水平^[42,43]。多形拟杆菌 (*Bacteroides thetaiotaomicron*) 参与调节肠道黏膜免疫和营养物质代谢，能够提高宿主的营养利用率并维持肠道微生态

平衡^[44,45]。对体外发酵系统中的肠道有益菌丰度进行荧光定量 PCR 检测发现 S131 能够增加柔嫩梭菌属和多形拟杆菌属的相对丰度,但对乳杆菌属和双歧杆菌属的相对丰度无显著性影响。ETEC 显著降低了系统中双歧杆菌、多形拟杆菌属和柔嫩梭菌属的相对丰度,但对乳杆菌属的相对丰度无显著性影响。另外, S131 干预改善了 ETEC 造成的乳杆菌属、双歧杆菌属、多形拟杆菌和柔嫩梭菌属的降低,使其恢复正常水平。表明 S131 能够增加肠道有益菌,并缓解 ETEC 造成的肠道有益菌生长抑制。

3 结论

本研究以 HT-29 细胞与肠道菌群体外批量发酵模拟系统相结合,考察了嗜热链球菌 S131 对肠道屏障的改善作用、对 ETEC 损伤肠道的拮抗作用及对肠道有益菌的增殖效果。结果表明 S131 可能通过增强 HT-29 细胞的黏蛋白表达和紧密连接性并下调炎症反应来拮抗 ETEC 对肠上皮细胞的损伤,同时对 ETEC 造成的 HT-29 细胞 AQP-3 表达下调也能够起到一定的缓解作用。S131 增加了柔嫩梭菌属和多形拟杆菌属的相对丰度,并改善了 ETEC 造成的有益菌种属降低。表明 S131 具有增强肠道屏障、拮抗致病菌损伤和调节肠道菌群的潜力。本研究采用的肠道菌群体外批量发酵系统与 HT-29 细胞相结合的方法能够在一定程度反映嗜热链球菌对肠道健康的调控,但其在体内的作用机制还需更严格的动物实验和临床研究来验证。

参考文献

[1] 张彦位,路江浩,鄢梦洁,等.益生菌对微生态系统的改善作用及其应用研究进展[J].食品工业科技,2021,42(4):369-379.

[2] Libertucci J, Young V B. The role of the microbiota in infectious diseases [J]. Nature Microbiology, 2019, 4(1): 35-45.

[3] Van Der Hee B, Wells J M. Microbial regulation of host physiology by short-chain fatty acids [J]. Trends in Microbiology, 2021, 29(8): 700-712.

[4] Wang L, Wang L, Tian P, et al. A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of *Bifidobacterium bifidum* CCFM16 for manipulation of the gut microbiota and relief from chronic constipation [J]. Food & Function, 2022, 13(3): 1628-1640.

[5] 臧凯丽,江岩,孙勇,等.益生菌剂调整肠道疾病人群菌群结构丰度水平的研究[J].食品科学,2018,39(13):133-143.

[6] Szajewska H, Kotowska M, Mrukowicz J Z, et al. Efficacy of *Lactobacillus* GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants [J]. The Journal of Pediatrics, 2006, 138(3): 361-365.

[7] Evansm, Salewski R P, Christman M C, et al. Effectiveness

of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus rhamnosus* for the management of antibiotic-associated diarrhoea in healthy adults: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial [J]. British Journal of Nutrition, 2016, 116(1): 94-103.

[8] 胡明珍.副干酪乳杆菌 NXU--19004 发酵枸杞汁的条件优化及其对小鼠便秘的改善作用研究[D].银川:宁夏大学,2021.

[9] Castro-Mejia J L, O'ferrall S, Krych S, et al. Restitution of gut microbiota in Ugandan children administered with probiotics (*Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12) during treatment for severe acute malnutrition [J]. Gut Microbes, 2020, 11(4): 855-867.

[10] Nobutani K, Sawada D, Fujiwara S, et al. The effects of administration of the *Lactobacillus gasseri* strain CP2305 on quality of life, clinical symptoms and changes in gene expression in patients with irritable bowel syndrome [J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 122(1): 212-224.

[11] Palumbo Vd, Romeo M, Marino Gammazza A, et al. The long-term effects of probiotics in the therapy of ulcerative colitis: A clinical study [J]. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2016, 160(3): 372-377.

[12] 孔令慧,赵林森,夏永军,等.嗜热链球菌胞外多糖生物合成的研究进展[J].食品安全质量检测学报,2019,10(2):284-290.

[13] 陈军奎,刘伟,王欣,等.成年人不同阶段肠道菌群及其代谢差异的研究[J].胃肠病学和肝病杂志,2019,28(3):276-281.

[14] 张秋月,王刚,陈坤朋,等.嗜酸乳杆菌在初始弱酸碱条件下对 HT-29 细胞免疫因子的调节作用[J].食品科学,2020,41(19):197-197.

[15] 杨玲,贾洪利,严超,等.双歧杆菌发酵乳对人体的肠道调节作用研究[J].食品科技,2021,43(6):7-13.

[16] Fooks L J, Gibson G R. Probiotics as modulators of the gut flora [J]. British Journal of Nutrition, 2002, 88(S1): 39-49.

[17] 吴姚平.肠道微生物对肠道屏障影响的初步探究[D].南昌:南昌大学,2017.

[18] Johansson M E, Hansson G C. Immunological aspects of intestinal mucus and mucins [J]. Nature Reviews Immunology, 2016, 16(10): 639-649.

[19] 尉秀清,姚集鲁,文卓夫.肠道粘膜屏障功能及其临床检测[J].国外医学(内科学分册),2004,31(10):415-418.

[20] Bjarnason I, Macpherson A, Hollander D. Intestinal permeability: An overview [J]. Gastroenterology, 1995, 108(5): 1566-1581.

[21] 朱翠,师子彪,蒋宗勇,等.乳酸杆菌在调节肠道屏障功能中的作用[J].中国畜牧兽医,2012,39(9):5.

[22] Peng L, Li Z, Green R S, et al. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via

- activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers [J]. *Journal of Nutrition*, 2009, 139(9): 1619.
- [23] 张中伟,秦环龙.致病菌调控肠道上皮紧密连接的分子机制研究[J].*肠外与肠内营养*,2006,13(4):237-239.
- [24] Sawada N, Murata M, Kikuchi K, et al. Tight junctions and human diseases [J]. *Medical Electron Microscopy*, 2003, 36(3): 147-156.
- [25] Wu Y, Zhu C, Chen Z, et al. Protective effects of *Lactobacillus plantarum* on epithelial barrier disruption caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* in intestinal porcine epithelial cells [J]. *Veterinary Immunology & Immunopathology*, 2016, 172: 55-63.
- [26] De La Fuente-Nunez C, Menegueti B T, Franco O L, et al. Neuromicrobiology: How microbes influence the brain [J]. *ACS Chemical Neuroscience*, 2017, 9(2): 141-150.
- [27] 岳月.不同乳杆菌对产肠毒素大肠杆菌所导致的腹泻的缓解作用及机制研究[D].无锡:江南大学,2021.
- [28] Boucher H W, Talbot G H, Bradley J S, et al. Bad bugs, no drugs: No escape! An update from the infectious diseases society of america [J]. *Yearbook of Surgery*, 2009, 48(1): 1-12.
- [29] 郭远骥,妥彦峰,牟光庆,等.植物乳杆菌 35 对大肠杆菌在肠上皮细胞 HT-29 上黏附及刺激产生促炎细胞因子的影响[J].*现代食品科技*,2017,33(3):14-21.
- [30] Candela M, Perna F, Carnevali P, et al. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: Adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 125(3): 286-292.
- [31] Lee J S, Awji E G, Lee S J, et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* CJLP243 on the growth performance and cytokine response of weaning pigs challenged with *Enterotoxigenic Escherichia coli* [J]. *Journal of Animal Science*, 2012, 90(11): 3709-3717.
- [32] Yoda K, He F, Kawase M, et al. Oral administration of *Lactobacillus gasseri* TMC0356 stimulates peritoneal macrophages and attenuates general symptoms caused by *Enteropathogenic Escherichia coli* infection [J]. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2014, 47(2): 81-86.
- [33] Li X, Zhu Y, Zhang H, et al. Risks associated with high-dose *Lactobacillus rhamnosus* in an *Escherichia coli* model of piglet diarrhoea: Intestinal microbiota and immune imbalances [J]. *Plos One*, 2012, 7(7): e40666.
- [34] King L S, Kozono D, Agre P. From structure to disease: The evolving tale of aquaporin biology [J]. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2004, 5(9): 687-698.
- [35] Gallardop, Cid P, Vio C P, et al. Aquaporin-2, a regulated water channel, is expressed in apical membranes of rat distal colon epithelium [J]. *American Journal of Physiology Gastrointestinal & Liver Physiology*, 2001, 281(3): G856-G863.
- [36] Matsuzaki T, Tajika Y, Ablimit A, et al. Aquaporins in the digestive system [J]. *Acta Academiae Medicinae Militariae Tertiae*, 2005, 37(2): 71-80.
- [37] Ikarashi N, Kon R, Iizasa T, et al. Inhibition of aquaporin-3 water channel in the colon induces diarrhea [J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2012, 35(6): 957-962.
- [38] Wu T, Shiy, Zhang Y, et al. *Lactobacillus rhamnosus* LB1 alleviates enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced adverse effects in piglets by improving host immune response and anti-oxidation stress and restoring intestinal integrity [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 724401.
- [39] Garcia M A, Nelson W J, Chavez N. Cell-cell junctions organize structural and signaling networks [J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2018, 10(4): a029181.
- [40] Von Mentzer A, Connor T R, Wieler L H, et al. Identification of *Enterotoxigenic Escherichia coli* (EPEC) clades with long-term global distribution [J]. *Nature Genetics*, 2014, 46(12): 1321-1326.
- [41] Isidean S D, Riddle M S, Savarino C K, et al. A systematic review of EPEC epidemiology focusing on colonization factor and toxin expression [J]. *Vaccine*, 2011, 29(37): 6167-6178.
- [42] Heinkena, Khan M, Paglia G, et al. Functional metabolic Map of faecalibacterium prausnitzii, a beneficial human gut microbe [J]. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(18): 3289-3302.
- [43] Lopez-Slies M, Duncan S H, Garcia-Gil L J, et al. *Faecalibacterium prausnitzii*: From microbiology to diagnostics and prognostics [J]. *International Society for Microbial Ecology*, 2017, 11: 841-852.
- [44] Zocco M A, Ainorame, Gasbarrini G, et al. *Bacteroides thetaiotaomicron* in the gut: Molecular aspects of their interaction [J]. *Digestive and Liver Disease*, 2007, 39(8): 707-712.
- [45] Hsiehs, Porter N T, Donermeyer D L, et al. Polysaccharide capsules equip the human symbiont *Bacteroides thetaiotaomicron* to modulate immune responses to a dominant antigen in the intestine [J]. *Journal of Immunology*, 2020, 204(4): 1035-1046.