

# 益生菌制剂对抗生素诱导腹泻模型 小鼠肠道菌群的调节作用

黄莉莉, 颜克旭, 李玟玟, 张振华, 马青, 马微微\*  
(黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

**摘要:** 研究了益生菌制剂对腹泻模型 (Antibiotic-Associated Diarrhea, AAD) 小鼠肠道菌群的调节作用。BALB/c 小鼠随机分为 6 组, 每组 8 只, 灌胃给予氨苄青霉素 (22.4 g/kg), 建立小鼠腹泻模型, 空白组给予等体积生理盐水。模型建立后, 阳性组灌胃给予培菲康 (8 g/kg)、益生菌制剂低、中、高剂量组 ( $2.5 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$  CFU) 给予复合益生菌制剂, 模型组和空白组给予等体积生理盐水, 连续 14 d。观察益生菌制剂对小鼠体质量、稀便率、稀便级和腹泻指数的影响, 测定小鼠 IgA、IgG 水平, 肠道屏障功能相关基因表达水平以及肠道菌群组成。结果表明, 与模型组相比三个剂量组在给予益生菌第 14 天时小鼠稀便率、稀便级和腹泻指数显著降低, IgA 水平分别提高 13.30%、20.25%、25.83%, IgG 水平分别提高 6.84%、19.81%、29.64%, TLR4 基因表达水平下调 16.88%、20.78%、40.91%, NF- $\kappa$ B 基因表达水平下调 24.91%、37.19%、55.79%, 肠道双歧杆菌、乳杆菌数量明显增加, 产气荚膜梭菌、肠球菌、肠杆菌数量明显减少。综上所述, 益生菌制剂通过调节肠道菌群, 调节免疫球蛋白水平, 发挥改善 AAD 作用。

**关键词:** 益生菌; 抗生素相关性腹泻; 免疫球蛋白; 肠道菌群

文章编号: 1673-9078(2024)02-1-8

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.2.1579

## Regulation Effect of Probiotics on the Intestinal Bacteria in Mice with Antibiotic-associated Diarrhea

HUANG Lili, YAN Kexu, LI Wenwen, ZHANG Zhenhua, MA Qing, MA Weiwei\*

(College of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

**Abstract:** The regulatory effects of probiotics on intestinal flora in antibiotic-associated diarrhea (AAD) mice were investigated. BALB/c mice were randomly divided into 6 groups (8 mice per group). The AAD model was established by intragastric administration of ampicillin 22.4 g/kg, and the blank group was given the same volume of normal saline. After the model was successfully established, the positive group was given bifido (8 g/kg), the low-dose, medium-dose and high-dose probiotics groups ( $2.5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  CFU, respectively) were given compound probiotics, and the model group and blank group were given the same volume of normal saline for 14 consecutive days. The effects of probiotics on the body weight, rate of loose stool, grade of loose stool and diarrhea index in mice, and the serum immunoglobulin IgA and

引文格式:

黄莉莉, 颜克旭, 李玟玟, 等. 益生菌制剂对抗生素诱导腹泻模型小鼠肠道菌群的调节作用[J]. 现代食品科技, 2024, 40(2):1-8.

HUANG Lili, YAN Kexu, LI Wenwen, et al. Regulation effect of probiotics on the intestinal bacteria in mice with antibiotic-associated diarrhea [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(2): 1-8.

收稿日期: 2022-12-13

基金项目: 黑龙江省自然科学基金 (LH2019H106); 黑龙江省“头雁”团队支持项目 (黑龙江省头雁行动领导小组文件 (2019) 5 号)

作者简介: 黄莉莉 (1978-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 中药及天然药物生物活性与机制, E-mail: huanglili@hljucm.com

通讯作者: 马微微 (1978-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 药用资源开发利用, E-mail: mawei-wei@163.com

IgG levels, the expression levels of the genes related to intestinal barrier function were determined. The results showed that compared with the AAD model group, the loose stool rate, loose stool grade and diarrhea index of mice of the three probiotics groups all decreased significantly, whilst the the serum IgA and IgG levels increased by 13.30%, 20.25%, 25.83% and 6.84%, 19.81%, 29.64%, respectively, the expression levels decreased by 16.88%, 20.78% and 40.91%, respectively, for *TLR4*, and by 24.91%, 37.19% and 55.79%, respectively, for *NF- $\kappa$ B*; the number of viable bacteria of intestinal *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* increased, whilst the number of viable bacteria of *Clostridium perfringens*, *Enterococcus* and *Enterobacillus* decreased. In conclusion, probiotics can ameliorate AAD by regulating intestinal flora and levels of immunoglobulins.

**Key words:** probiotics; antibiotic-associated diarrhea; immunoglobulin; intestinal flora

抗生素的发展与应用极大地促进了医药产业发展,我国住院患者抗生素使用率高达80%<sup>[1]</sup>,然而在长期使用抗生素的成人中,抗生素相关性腹泻(Antibiotic-Associated Diarrhea, AAD)发病率为5%至39%,严重危害患者生命健康<sup>[2,3]</sup>。研究表明,肠道菌群与AAD的发病关系密切,抗生素使肠道菌群紊乱是AAD发生和发展的基础<sup>[4,5]</sup>。抗生素会使肠道内有益细菌减少甚至死亡,其菌株定植抗力被破坏,导致条件致病菌大量繁殖,肠道菌群失衡,肠道屏障破坏,从而使肠源性感染风险增加,最终引起抗生素相关性腹泻的发生<sup>[6,7]</sup>。因此,恢复抗生素导致的肠道菌群失调,是抗生素使用过程中不可忽视的重要内容,对于临床该病的防控具有重要意义<sup>[8]</sup>。

益生菌的定义为“含有足够数量的非致病性特定活菌微生物制剂<sup>[9]</sup>”,可通过分泌酶、营养物质及抑制有害菌的次级代谢产物,有效维持肠道菌群平衡,从而直接或间接地改善肠道屏障功能<sup>[10]</sup>,发挥有益作用。双歧杆菌和乳杆菌被认为是最具潜力的益生菌<sup>[11]</sup>。研究表明,乳酸双歧杆菌XLTG11、干酪乳杆菌Zhang、植物乳杆菌CCFM8661和鼠李糖乳杆菌Probio-M9具有良好的益生菌特性,如胃酸和胆盐耐受性<sup>[12-15]</sup>,此外,乳双歧杆菌XLTG11通过调节细胞因子和肠道菌群组成,抑制TLR4/MYD88/NF- $\kappa$ B信号通路的激活等,有效地缓解克林霉素诱导的小鼠AAD症状<sup>[16]</sup>。干酪乳杆菌Zhang可以提高肠粘膜杯状细胞数目,肠道屏障相关基因表达等,从而增强肠道屏障功能,保护肠道,发挥预防腹泻的作用<sup>[17]</sup>。植物乳杆菌通过调节肠道菌群平衡,改善肠道代谢紊乱,增强肠道免疫功能,从而对葡聚糖硫酸钠诱导的实验性结肠炎发挥预防作用<sup>[18]</sup>。鼠李糖乳杆菌具有高耐酸性、高耐胆汁性、强黏附力和良好的生长特性<sup>[19]</sup>,鼠李糖乳杆菌可通过促进葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎小鼠模型肠道中有益菌增殖,抑制有

害菌增殖,逆转模型小鼠的肠道微生物群结构失调<sup>[20,21]</sup>。这些益生菌在调节肠道菌群,增强肠道屏障功能和支持机体免疫系统健康方面具有不同的重要作用<sup>[22,23]</sup>,但其多菌种组合是否具有缓解AAD的作用相关研究未见报道。

因此,本研究探讨一种复合益生菌制剂对AAD模型小鼠肠道菌群的调节作用,为临床改善抗生素相关性腹泻以及复合益生菌微生态制剂产品开发和利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验药物

益生菌制剂(主要成分为乳双歧杆菌XLTG11、干酪乳杆菌Zhang、植物乳杆菌CCFM8661、鼠李糖乳杆菌Probio-M9),金华银河生物科技有限公司;注射用氨苄青霉素钠,上海源叶生物科技有限公司;培菲康,上海上药信谊药厂有限公司。

#### 1.1.2 实验动物

SPF级雄性BALB/c小鼠48只,6~8周龄,体质量18~20g,由辽宁长生生物技术股份有限公司提供,动物合格证号:动物许可证号:SCXK(辽)2020-0001。实验动物饲养于屏障环境动物室,期间自由饮水、摄食,温度控制在20~23℃,12h明暗交替。所有动物操作均按照黑龙江中医药大学《实验动物管理条例》进行,实验经黑龙江中医药大学动物伦理委员会批准(伦理审批代码:2021121201)。

#### 1.1.3 试剂和仪器

小鼠血清IgA、IgG酶联免疫吸附试剂盒,江苏酶免实业有限公司;异丙醇,天津市富宇精细化工有限公司;DEPC, Scientific research special公司;氯仿,天津市富宇精细化工有限公司;PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser、TB Green Premix

Ex Taq™ II, 大连宝生物公司。

高压蒸汽灭菌器 (MLS-3751L-PC) 和 -80 °C 冰箱 (MDF-382E), 日本 Panasonic 公司; 低温离心机 (SORVALL ST8/8R), 美国 TOMOS 公司; Synergy MX 全自动酶标仪 (SMATBCD), 美国 BIOTEK 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 小鼠模型构建及实验分组

BALB/c 小鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为 6 组, 每组 8 只, 分别为空白组、AAD 模型组、阳性药培菲康组和益生菌低、中、高剂量组。模型组, 阳性组和益生菌组小鼠每天灌胃给予氨苄青霉素 (22.4 g/kg), 分两次进行, 每次剂量为 (11.2 g/kg), 空白组小鼠每天同时间灌胃等体积生理盐水, 连续 3 d。模型构建成功的判断标准: 小鼠蜷缩, 活动减少, 精神萎靡, 肛周污秽, 屁股有明显污迹, 或造模组与空白组相比, 腹泻率和腹泻指数具有统计学差异<sup>[24-26]</sup>。

模型构建成功后开始给益生菌制剂, 正常组和模型组灌胃给予生理盐水, 阳性药组灌胃给予培菲康 (8 g/kg, 每只鼠给予活菌数不低于  $1 \times 10^7$  CFU), 益生菌低、中、高剂量组小鼠给予益生菌制剂 ( $2.5 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$  CFU), 连续 14 d。

### 1.2.2 益生菌制剂对腹泻小鼠体质量增重的影响

实验第 1 天即腹泻模型构建第一天早 8:00, 记录各组小鼠初始体质量, 随后再给予小鼠氨苄青霉素, 其余时间每天 18:00, 对每组小鼠进行体质量称量并记录。

### 1.2.3 益生菌制剂对腹泻小鼠稀便率、稀便级和腹泻指数的影响

造模后即实验第 3 天和给予益生菌 14 d 后即实验第 17 天, 观察并记录各组小鼠的稀便数、干便数、粪便总数并对稀便等级进行评定, 计算小鼠的

稀便率、稀便级和腹泻指数。稀便率: 每只动物所排的稀便数与总便数之比。稀便级: 表示稀便的程度, 以稀便污染滤纸形成污迹面积的大小定级, 标准如表 1 所示。腹泻指数: 稀便率与稀便级的乘积。

表 1 稀便级别判断标准

Table 1 Criteria to determine the degree of loose stool

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

### 1.2.4 益生菌制剂对腹泻小鼠血清免疫球蛋白 IgA、IgG 水平的影响

末次给益生菌制剂后 1 h, 各组小鼠眼眶取血, 3 000 r/min 离心 10 min, 取血清分装 -80 °C 冰箱冷冻待测。ELISA 试剂盒检测血清 IgA、IgG 水平, 操作步骤按说明书进行。

### 1.2.5 益生菌制剂对腹泻小鼠结肠 TLR4/NF- $\kappa$ B mRNA 表达的影响

采集小鼠结肠 2 cm, 参照 TaKaRa 试剂盒提取细胞总 RNA 操作说明书提取结肠组织内的总 RNA, 按照 TaKaRa 公司的 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒操作步骤进行反转录反应合成 cDNA, 按照 TaKaRa 公司的 TB Green® Premix Ex Taq™ II 试剂盒配置反应液, 用实时荧光定量 PCR 系统 (Quant Studio 3) 进行扩增。引物见表 2, 反应条件: 预变性 95 °C 30 s, PCR 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 循环 40 次, 测定目的基因的 Ct 值和内参基因  $\beta$ -actin 的 Ct 值, 按照  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算样本中目的基因 mRNA 的相对表达水平。

表 2 RT-PCR 引物序列的设计

Table 2 Design of RT-PCR primer sequences

基因	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
<i>TLR4</i>	GCTCTCAGCCATCCACAAAG	GAGTCGGAAGAGGAAGAGG
<i>NF-<math>\kappa</math>B</i>	AGAGGATTTTCGATCCGCTA	CGTGAAGTATCCAGGTTTG
<i><math>\beta</math>-actin</i>	GGTTGTCTCCTGCGACTTCA	TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC

### 1.2.6 益生菌制剂对腹泻小鼠肠道菌群的影响

在造模后和末次给益生菌制剂后 30 min, 无菌采取小鼠粪便, 样品 10 倍稀释至  $10^{-8}$ , 选择适宜的稀释度, 分别将样品接种在 BBL 琼脂培养基、

MRS 培养基、TSC 琼脂培养基、改良 GAM 琼脂培养基、叠氮化钠 - 结晶紫 - 七叶苷培养基和 VRPD 培养基中。经培养后, 分别计算出每克湿粪便中双歧杆菌、乳杆菌、产气荚膜梭菌、肠球菌、肠杆菌



和拟杆菌的菌数,结果以单位质量粪便菌落形成单位的对数值表示 (lg CFU/g)。

### 1.2.7 统计学分析

应用 SPSS 26.0 统计软件,实验数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,对两组以上数据进行显著性检验时采用单因素方差分析方法, LSD 法进行两两比较,  $P < 0.05$  具有显著性差异,对一组数据干预前后比较使用配对样本  $t$  检验,  $P < 0.05$  具有显著性差异,相关性分析使用 Spearman 方法。

## 2 结果与讨论

### 2.1 益生菌制剂对腹泻小鼠体质量变化的影响

由表 3 可知,与空白组比较,造模期间其余

各组小鼠体质量增长缓慢 ( $P < 0.001$ ),与模型组比较,各益生菌制剂组小鼠体质量增长无显著性差异,提示模型构建成功。给予益生菌制剂 7 d 后,与空白组比较,模型组体质量增长无显著性差异,阳性组体质量增长 30.19% ( $P < 0.01$ ),益生菌高剂量组体质量增长 22.08% ( $P < 0.05$ ),与模型组比较,阳性组、益生菌中、高剂量组小鼠体质量分别增长 44.77% ( $P < 0.001$ )、26.35% ( $P < 0.05$ )、35.74% ( $P < 0.01$ ),给益生菌制剂 14 d 时,与空白组比较,模型组小鼠体质量增长无显著性差异,与模型组比较,各组小鼠体质量均有不同程度升高,且呈剂量依赖性,以阳性组和益生菌高剂量组最为显著,分别增长 50.72% 和 26.36% ( $P < 0.05$ )。

表 3 各组小鼠体质量变化情况

Table 3 Body weight of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	造模前体质量/g	造模后体质量/g	造模期间体质量增加量/ $\Delta g$	灌服益生菌制剂期间(共 14 d)			
				7 d 后体质量/g	1~7 d 体质量增加量/ $\Delta g$	14 d 后体质量/g	8~14 d 体质量增加量/ $\Delta g$
空白组	19.10 ± 0.28	23.41 ± 0.28	4.31 ± 0.39	24.44 ± 0.53	3.08 ± 0.57	26.26 ± 0.53	3.83 ± 0.51
模型组	21.69 ± 0.72	21.94 ± 0.77	0.25 ± 0.89***	22.53 ± 0.76	2.77 ± 0.29	24.01 ± 0.61	3.49 ± 0.58
阳性组	20.63 ± 0.56	20.84 ± 0.94	0.22 ± 0.92***	22.86 ± 0.91	4.01 ± 0.78**###	25.13 ± 0.98	5.26 ± 0.69#
低剂量组	21.49 ± 0.26	21.68 ± 0.91	0.19 ± 0.93***	22.73 ± 1.28	3.10 ± 0.77	24.54 ± 1.04	3.81 ± 0.75
中剂量组	20.76 ± 0.34	20.96 ± 0.98	0.2 ± 0.82***	22.79 ± 1.41	3.50 ± 0.63#	24.73 ± 1.32	3.94 ± 0.68
高剂量组	21.65 ± 0.50	21.81 ± 1.11	0.16 ± 1.02***	23.50 ± 1.11	3.76 ± 0.52***	25.91 ± 0.82	4.41 ± 0.89#

注:与空白组相比 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ;与模型组相比 # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ 。下表同。

### 2.2 益生菌制剂对腹泻小鼠稀便率、稀便级和腹泻指数的影响

表 4 益生菌制剂对腹泻小鼠稀便率的影响

Table 4 Effect of probiotics on loose stool rate in mice with diarrhea ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	造模后/%	给益生菌制剂后/%
空白组	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型组	81.49 ± 11.07***	74.50 ± 12.52***
阳性组	77.90 ± 12.14***	59.08 ± 11.97****
低剂量组	74.19 ± 10.92***	70.50 ± 10.53***
中剂量组	80.71 ± 11.07***	61.50 ± 8.73****
高剂量组	79.46 ± 9.12***	48.25 ± 11.02****

由表 4 可知,与空白组比较,造模后其余各组小鼠稀便率具有显著性差异 ( $P < 0.001$ ),提示模型构建成功。给予益生菌制剂 14 d 后,与空白组比较,其余各组小鼠稀便率具有显著性差异 ( $P < 0.001$ ),与模型组比较,小鼠稀便率在阳性组、

益生菌中、高剂量组分别减少 20.70% ( $P < 0.01$ )、17.45% ( $P < 0.01$ )、35.23% ( $P < 0.001$ )。

由表 5 可知,与空白组比较,造模后其余各组小鼠稀便级和腹泻指数具有显著性差异 ( $P < 0.001$ ),与模型组比较,各组不具有显著性差异,提示模型构建成功。给益生菌制剂 14 d 后,与空白组比较,其余各组小鼠稀便级和腹泻指数具有显著性差异 ( $P < 0.001$ ),与模型组比较,阳性组、益生菌低、中、高剂量组小鼠稀便级分别下降 33.52% ( $P < 0.001$ )、20.88% ( $P < 0.001$ )、29.12% ( $P < 0.001$ )、35.71% ( $P < 0.001$ ) 腹泻指数分别下降 46.62% ( $P < 0.001$ )、23.31% ( $P < 0.001$ )、39.85% ( $P < 0.001$ )、58.65% ( $P < 0.001$ )。实验结果表明,四种益生菌制备的复合益生菌制剂以低剂量 ( $2.5 \times 10^6$  CFU) 和中剂量 ( $5 \times 10^6$  CFU) 给益生菌制剂小鼠 14 d 时,可以明显缓解 AAD 模型小鼠腹泻症状,降低稀便级、稀便率和腹泻指数,具有促

进小鼠生长的趋势,在高剂量( $1 \times 10^7$  CFU)时,不仅明显改善AAD模型小鼠腹泻症状,对小鼠生长也具有明显促进作用。与Yang等<sup>[27]</sup>使用乳酸菌素片、

含嗜热链球菌的酸奶和双歧三联活菌胶囊用以改善AAD模型小鼠的实验结果相似,在使用益生菌后,加快缓解腹泻且小鼠体质量的增长优于模型组。

表5 益生菌制剂对腹泻小鼠稀便级和腹泻指数的影响

Table 5 Effects of probiotics on loose stool grade and diarrhea index in mice with diarrhea ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	稀便级		腹泻指数	
	造模后/%	给益生菌制剂后/%	造模后/%	给益生菌制剂后/%
空白组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型组	1.50 ± 0.40 <sup>***</sup>	1.82 ± 0.17 <sup>***</sup>	1.22 ± 0.35 <sup>***</sup>	1.33 ± 0.31 <sup>***</sup>
阳性组	1.53 ± 0.49 <sup>***</sup>	1.21 ± 0.15 <sup>***##</sup>	1.18 ± 0.38 <sup>***</sup>	0.71 ± 0.16 <sup>***##</sup>
低剂量组	1.50 ± 0.44 <sup>***</sup>	1.44 ± 0.27 <sup>***##</sup>	1.12 ± 0.38 <sup>***</sup>	1.02 ± 0.22 <sup>***##</sup>
中剂量组	1.46 ± 0.22 <sup>***</sup>	1.29 ± 0.17 <sup>***##</sup>	1.19 ± 0.30 <sup>***</sup>	0.80 ± 0.17 <sup>***##</sup>
高剂量组	1.51 ± 0.34 <sup>***</sup>	1.17 ± 0.15 <sup>***##</sup>	1.19 ± 0.23 <sup>***</sup>	0.55 ± 0.11 <sup>***##</sup>

### 2.3 益生菌制剂对腹泻小鼠血清免疫球蛋白IgA、IgG水平的影响

由表6可知,给益生菌制剂14 d后,与空白组比较,模型组血清IgA、IgG水平分别降低23.66% ( $P < 0.01$ )、17.41% ( $P < 0.05$ )。与模型组相比,阳性对照组血清IgA、IgG水平分别升高23.13% ( $P < 0.05$ )、27.53% ( $P < 0.01$ ),益生菌中剂量组血清IgA、IgG水平分别升高20.25% ( $P < 0.05$ )、19.81% ( $P < 0.05$ ),益生菌高剂量组血清IgA、IgG水平分别升高25.83% ( $P < 0.01$ )、29.64% ( $P < 0.01$ ),提示复合益生菌制剂改善AAD模型小鼠血清免疫球蛋白IgA和IgG水平具有剂量依赖性。复合益生菌中剂量和高剂量给予AAD模型小鼠可提高小鼠血清免疫球蛋白IgA和IgG水平,明显改善AAD导致的小鼠机体免疫功能低下。Ya等<sup>[13]</sup>研究表明干酪乳杆菌Zhang可通过释放到循环血液中的细胞因子增强小鼠的免疫功能,且促进分泌性免疫球蛋白A (sIgA)的产生,这与本研究结果相似。因此,推测此复合益生菌制剂改善AAD导致的小鼠免疫功能下降,与促进细胞因子释放相关。

### 2.4 益生菌制剂对腹泻小鼠结肠TLR4/NF-κB mRNA表达的影响

肠道菌群营养功能的主要方面之一是适应性免疫系统的诱导和调节<sup>[5,28]</sup>,当肠道菌群失衡时,机体免疫系统会受到影响。TLR4/NF-κB信号通路活化可放大炎症效应,影响肠道能量代谢,导致肠黏膜功能受损,影响肠道消化吸收,造成慢性腹泻<sup>[29]</sup>。Wang等<sup>[12]</sup>研究表明,炎症性肠病发生时,NF-κB信号通路表达增加,而乳双歧杆菌XLTG11

可通过抑制TLR4/NF-κB信号通路激活减轻结肠炎症。本实验结果如下,各组TLR4和NF-κB基因表达水平见表7。给益生菌制剂14 d后,与空白组比较,模型组TLR4和NF-κB基因表达水平显著上调( $P < 0.05$ ),这与其研究结果相一致。与模型组相比,阳性对照组、益生菌低、中、高剂量组TLR4基因表达水平分别下调28.90%、16.88%、20.78%、40.91% ( $P < 0.001$ ),NF-κB基因表达水平分别下调50.88%、24.91%、37.19%、55.79% ( $P < 0.001$ ),提示复合益生菌制剂具有明显改善AAD的作用。

表6 益生菌制剂对腹泻小鼠血清免疫球蛋白IgA、IgG水平的影响

Table 6 Effects of probiotics on serum immunoglobulin IgA and IgG levels in mice with diarrhea ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	IgA/(ng/mL)	IgG/(ng/mL)
空白组	62.42 ± 7.36	513.21 ± 81.97
模型组	47.65 ± 7.73 <sup>**</sup>	423.87 ± 55.73 <sup>*</sup>
阳性组	58.67 ± 8.03 <sup>#</sup>	540.57 ± 68.60 <sup>##</sup>
低剂量组	53.99 ± 10.23	452.85 ± 59.61
中剂量组	57.30 ± 10.36 <sup>#</sup>	507.83 ± 77.41 <sup>#</sup>
高剂量组	59.96 ± 9.71 <sup>##</sup>	549.52 ± 51.89 <sup>##</sup>

表7 益生菌制剂对腹泻小鼠结肠TLR4/NF-κB mRNA表达的影响

Table 7 Effect of probiotics on TLR4 and NF-κB mRNA expression in colon of mice with diarrhea

组别	TLR4	NF-κB
空白组	1.00 ± 0.19	1.00 ± 0.24
模型组	3.08 ± 0.58 <sup>***</sup>	2.85 ± 0.75 <sup>***</sup>
阳性组	2.19 ± 0.19 <sup>###</sup>	1.40 ± 0.20 <sup>###</sup>
低剂量组	2.56 ± 0.32 <sup>##</sup>	2.14 ± 0.36 <sup>##</sup>
中剂量组	2.44 ± 0.18 <sup>##</sup>	1.79 ± 0.31 <sup>###</sup>
高剂量组	1.82 ± 0.28 <sup>###</sup>	1.26 ± 0.24 <sup>###</sup>

## 2.5 益生菌制剂对腹泻小鼠肠道菌群的影响

肠道内共生菌双歧杆菌和乳杆菌是人或动物肠道中优势菌之一,通过多种途径增强肠道屏障功能<sup>[30,31]</sup>,肠道菌群失衡时,双歧杆菌和乳杆菌相对丰度降低,肠球菌、肠杆菌以及AAD主要致病菌产气荚膜菌等条件致病菌相对丰度大幅度增加,从而诱发肠道疾病<sup>[32]</sup>。给予益生菌制剂前后各组小鼠菌群变化见表8,与实验造模第3天即给予益生菌制剂前比较,模型组小鼠在实验第17天时,双歧杆菌、乳杆菌和肠杆菌菌群数量均有恢复( $P<0.001$ ),肠球菌和产气荚膜菌菌群数量均有恢复( $P<0.01$ ),但都未达到健康水平,阳性组和益生菌低、中、高剂量组双歧杆菌、乳杆菌、肠杆菌、肠球菌和产气荚膜菌菌群数量均有恢复( $P<0.001$ ),以阳性组、益生菌中和高剂量组恢复程度最大,达到空白组水平。

实验第17天即给益生菌制剂后各组小鼠肠道菌群变化见表8,与空白组比较,模型组双歧杆菌和乳杆菌数量显著降低( $P<0.01$ ),肠杆菌、肠球菌和产气荚膜菌数量显著升高( $P<0.001$ ),提

示模型小鼠肠道菌群失衡。与3d时比较,第17天时阳性组双歧杆菌和乳杆菌数量分别升高39.39%、37.11% ( $P<0.001$ ),肠杆菌、肠球菌和产气荚膜菌数量分别降低9.03%、8.93%、16.00% ( $P<0.001$ )。复合益生菌低剂量组双歧杆菌,乳杆菌分别升高30.54% ( $P<0.01$ )、30.20% ( $P<0.001$ ),肠杆菌、肠球菌和产气荚膜菌数量分别降低7.31% ( $P<0.01$ )、6.58%、11.36% ( $P<0.001$ )。复合益生菌中剂量组双歧杆菌,乳杆菌数量分别升高38.92%、32.19% ( $P<0.001$ ),肠杆菌、肠球菌和产气荚膜菌数量分别降低9.15%、7.05%、13.14% ( $P<0.001$ )。复合益生菌高剂量组双歧杆菌、乳杆菌数量分别升高42.25%、37.39% ( $P<0.001$ ),肠杆菌、肠球菌和产气荚膜菌数量分别降低16.71%、10.16%、16.91% ( $P<0.001$ )。实验结果表明,乳双歧杆菌XLTG11、干酪乳杆菌Zhang、植物乳杆菌CCFM8661和鼠李糖乳杆菌混合制备的复合益生菌制剂对AAD小鼠具有明显的肠道菌群调节作用,可以缓解抗生素相关性腹泻症状,且呈剂量依赖性。

表8 各组小鼠给益生菌制剂前后肠道菌群变化(自身对照)

Table 8 Changes of intestinal microbiota before and after administration (self control)

组别	时间/d	双歧杆菌	乳杆菌	肠杆菌	肠球菌	产气荚膜梭菌
空白组	3	9.67 ± 0.06	9.39 ± 0.05	6.86 ± 0.05	6.78 ± 0.14	6.80 ± 0.06
	17	9.69 ± 0.07	9.43 ± 0.07	6.86 ± 0.07	6.83 ± 0.06	6.85 ± 0.06
模型组	3	6.87 ± 0.13	7.03 ± 0.12	7.61 ± 0.12	7.59 ± 0.12	8.06 ± 0.12
	17	8.83 ± 0.11***	8.66 ± 0.16***	7.14 ± 0.09***	7.37 ± 0.03**	7.82 ± 0.11**
阳性组	3	6.88 ± 0.12	6.98 ± 0.10	7.53 ± 0.12	7.50 ± 0.12	8.00 ± 0.08
	17	9.59 ± 0.08***	9.57 ± 0.10***	6.85 ± 0.09***	6.83 ± 0.09***	6.72 ± 0.08***
低剂量组	3	6.91 ± 0.12	7.02 ± 0.11	7.52 ± 0.11	7.60 ± 0.11	8.01 ± 0.11
	17	9.02 ± 0.12***	9.14 ± 0.11***	6.97 ± 0.10***	7.10 ± 0.06***	7.10 ± 0.10***
中剂量组	3	6.91 ± 0.13	7.02 ± 0.10	7.54 ± 0.08	7.52 ± 0.12	8.07 ± 0.12
	17	9.60 ± 0.10***	9.28 ± 0.12***	6.85 ± 0.10***	6.99 ± 0.09***	7.01 ± 0.11***
高剂量组	3	6.84 ± 0.13	7.06 ± 0.12	7.54 ± 0.09	7.58 ± 0.11	8.04 ± 0.10
	17	9.73 ± 0.12***	9.70 ± 0.14***	6.82 ± 0.09***	6.81 ± 0.10***	6.68 ± 0.12***

注: \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , 与该组造模后即实验第3天比较。

表9 各组小鼠给益生菌制剂后肠道菌群变化(组间对照)

Table 9 Changes of intestinal microbiota after administration (comparison between groups)

组别	双歧杆菌	乳杆菌	肠杆菌	肠球菌	产气荚膜梭菌
空白组	9.69 ± 0.07	9.43 ± 0.07	6.86 ± 0.07	6.83 ± 0.06	6.85 ± 0.06
模型组	8.83 ± 0.11***	8.66 ± 0.16***	7.14 ± 0.09***	7.37 ± 0.03***	7.82 ± 0.11***
阳性组	9.59 ± 0.08###	9.57 ± 0.10###	6.85 ± 0.09###	6.83 ± 0.09###	6.72 ± 0.08###
低剂量组	9.02 ± 0.12##	9.14 ± 0.11###	6.97 ± 0.10##	7.10 ± 0.06###	7.10 ± 0.10###
中剂量组	9.60 ± 0.10###	9.28 ± 0.12###	6.85 ± 0.10###	6.99 ± 0.09###	7.01 ± 0.11###
高剂量组	9.73 ± 0.12###	9.70 ± 0.14###	6.82 ± 0.09###	6.81 ± 0.10###	6.68 ± 0.12###

注: \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , 与空白组相比; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ , ### $P<0.001$ , 与模型组相比。



## 2.6 小鼠肠道菌群变化与腹泻结果和IgA、IgG水平相关性分析

采用 Spearman 分析方法分析菌群变化与腹泻结果和 IgA、IgG 水平的关系。由图 1 可知，双歧杆菌和乳杆菌含量与稀便率、稀便级和腹泻指数呈显著负相关 ( $P < 0.001$ )，肠球菌、肠杆菌与产气荚膜梭菌含量与稀便率、稀便级和腹泻指数呈显著正相关 ( $P < 0.01$ )。双歧杆菌含量的变化对 IgA、IgG 水平影响不显著。乳杆菌与 IgG 水平呈显著正相关 ( $P < 0.01$ )，而肠杆菌、肠球菌和产气荚膜梭菌与 IgG 水平呈显著负相关 ( $P < 0.05$ )。尽管有部分文献报道双歧杆菌、乳杆菌具有调节血清 IgA、IgG 水平<sup>[33-35]</sup>，但在相关性分析中这种关系并不明显。推测可能因双歧杆菌、乳杆菌等益生菌相对丰度升高，减少有害菌的相对丰度，调节肠道菌群，从而调节 IgA、IgG 水平。

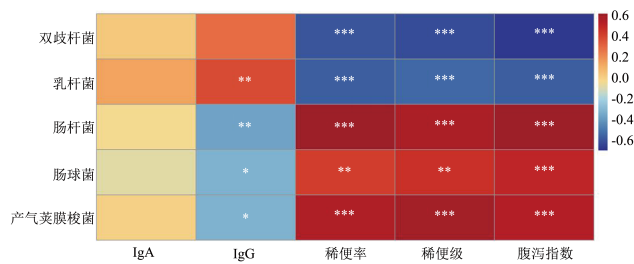


图 1 腹泻指标变化、细胞因子水平与菌群变化的相关性

Fig.1 Correlation analysis between diarrhea-related indexes, cytokine levels, and the changes of intestinal flora

注: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

## 3 结论

本实验以氨苄青霉素成功构建 AAD 小鼠模型。将乳双歧杆菌 XLTG11、干酪乳杆菌 Zhang、植物乳杆菌 CCFM8661、鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 以 1:1:1:1 的比例混合制备成复合益生菌制剂并给予模型小鼠低剂量 ( $2.5 \times 10^6$  CFU)、中剂量 ( $5 \times 10^6$  CFU) 和高剂量 ( $1 \times 10^7$  CFU) 14 d，小鼠腹泻症状明显改善，稀便率、稀便级和腹泻指数降低 ( $P < 0.01$ )，且高剂量下，小鼠体质量增长明显增加 ( $P < 0.05$ )。此外，给予模型小鼠中剂量和高剂量时，血清免疫球蛋白 IgA 和 IgG 水平明显提高 ( $P < 0.05$ )，呈剂量依赖性。同时，益生菌三个剂量组均可以显著下调小鼠结肠组织 *TLR4* 和 *NF- $\kappa$ B* 基因表达水平 ( $P < 0.01$ )，回调肠道中的双歧杆菌、乳杆菌、肠杆菌、肠球菌和产气荚膜梭菌菌群数量 ( $P < 0.001$ )。综上，由乳双歧杆菌 XLTG11、干酪

乳杆菌 Zhang、植物乳杆菌 CCFM8661 和鼠李糖乳杆菌混合制备的复合益生菌制剂对 AAD 小鼠肠道菌群具有明显调节作用，可以缓解抗生素相关性腹泻症状。此外，本实验中的益生菌制剂可通过调节小鼠肠道菌群从而缓解 AAD 致小鼠免疫力功能低下。

## 参考文献

- [1] 刘叶,杨悦.我国抗生素滥用现状分析及建议[J].中国现代医生,2016,54(29):160-164.
- [2] LIAO W, CHEN C, WEN T, et al. Probiotics for the prevention of antibiotic-associated diarrhea in adults: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials [J]. J Clin Gastroenterol, 2021, 55(6): 469-480.
- [3] CUI M, ZHOU R, WANG Y, et al. Beneficial effects of sulfated polysaccharides from the red seaweed *Gelidium pacificum* Okamura on mice with antibiotic-associated diarrhea [J]. Food & Function, 2020, 11(5): 4625-4637.
- [4] SHI Y, ZHAO X, ZHAO J, et al. A mixture of *Lactobacillus* species isolated from traditional fermented foods promote recovery from antibiotic-induced intestinal disruption in mice [J]. Journal of Applied Microbiology, 2018, 124(3): 842-854.
- [5] DETHLEFSEN L, RELMAN D A. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108 (Suppl 1): 4554-4561.
- [6] FRANCINO MP. Antibiotics and the human gut microbiome: dysbioses and accumulation of resistances [J]. Front Microbiol, 2016, 6: 1543.
- [7] JANDHYALA SM, Talukdar R, Subramanyam C, et al. Role of the normal gut microbiota [J]. World J Gastroenterol, 2015, 29: 8787-8803.
- [8] 解思友.抗生素相关性腹泻(AAD)的流行病学及临床分析[J].医学食疗与健康,2020,18(19):214-216.
- [9] AGAMENNONE V, KRUL C A M, RIJKERS G, et al. A practical guide for probiotics applied to the case of antibiotic-associated diarrhea in the Netherlands [J]. BMC Gastroenterol, 2018, 1: 103.
- [10] 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.
- [11] 王金铭,张如春,赵德辉,等.罗伊氏乳杆菌对大鼠不同类型腹泻的影响[J].特产研究,2023,45(3):51-58.
- [12] WANG N, WANG S, XU B, et al. Alleviation effects of *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* XLTG11 on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice [J]. Microorganisms, 2021, 9(10): 2093.

- [13] YA T, ZHANG Q, CHU F, et al. Immunological evaluation of *Lactobacillus casei* Zhang: a newly isolated strain from koumiss in Inner Mongolia, China [J]. BMC Immunol, 2008, 9: 68.
- [14] 田丰伟, 翟齐啸, 孙媛媛, 等. 缓解铅毒性植物乳杆菌 CCFM8661 的微生物学性质及其应用的研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(4): 1010-1015.
- [15] LIU W, CHEN M, DUO L, et al. Characterization of potentially probiotic lactic acid bacteria and *bifidobacteria* isolated from human colostrum [J]. J Dairy Sci, 2020, 5: 4013-4025.
- [16] 马岩, 王中江, 杨靖瑜, 等. 动物双歧杆菌乳亚种 XLTG11 对克林霉素诱导的抗生素相关性腹泻的改善作用 [J]. 食品科学, 2023, 44(3): 170-178.
- [17] 王誉颖, 汤林杰, 李姣, 等. 干酪乳杆菌对发育期腹泻模型大鼠回肠黏膜结构及 MUC2 含量的影响 [J]. 中国农业大学学报, 2019, 24(8): 94-101.
- [18] 魏俊淑. 植物乳杆菌调节小鼠肠道菌群预防 DSS 诱导结肠炎的研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2018.
- [19] SEGERS M E, LEBEER S. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG-host interactions [J]. Microb Cell Fact, 2014, 13(Suppl 1): S7.
- [20] YEO S, PARK H, SEO E, et al. Anti-inflammatory and gut microbiota modulatory effect of *Lactobacillus rhamnosus* strain LDTM 7511 in a dextran sulfate sodium-induced colitis murine model [J]. Microorganisms, 2020, 8(6): E845.
- [21] TONG L J, ZHANG X Y, HAO H N, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG derived extracellular vesicles modulate gut microbiota and attenuate inflammatory in DSS-induced colitis mice [J]. Nutrients, 2021, 13(10): 3319.
- [22] 李玟玟, 马微微, 马青, 等. 乳双歧杆菌 XLTG11 缓解环磷酰胺致小鼠免疫功能损伤 [J]. 现代食品科技, 2022, 38(8): 10-16.
- [23] 陈小玉, 邵庆亮. 益生菌治疗抗生素相关性腹泻的研究进展 [J]. 医学综述, 2021, 27(20): 4076-4080.
- [24] 姜卓希, 林志健, 张冰, 等. 土茯苓提取物改善抗生素腹泻小鼠肠道屏障的实验研究 [J]. 中国药物警戒, 2022, 19(8): 862-867.
- [25] XU B, LIANG S, ZHAO J, et al. *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* XLTG11 improves antibiotic-related diarrhea by alleviating inflammation, enhancing intestinal barrier function and regulating intestinal flora [J]. Food Funct, 2022, 13(11): 6404-6418.
- [26] 周干南, 胡芝华, 汪亚先, 等. 小鼠腹泻模型的制备与腹泻指数数的应用 [J]. 中草药, 1994, 4: 195-196, 199, 223-224.
- [27] YANG N, ZHAN Y, WAN J, et al. Effects of lacidophilin tablets, yogurt, and bifid triple viable capsules on the gut microbiota of mice with antibiotic-associated diarrhea [J]. Can J Infect Dis Med Microbiol, 2022, 22: 6521793.
- [28] ZHAO Q, Elson C O. Adaptive immune education by gut microbiota antigens [J]. Immunology, 2018, 154(1): 28-37.
- [29] 赖雁威, 刘丽娟, 黄艳平, 等. 大蒜素通过 TLR4/NF- $\kappa$ B 途径对慢性腹泻大鼠肠黏膜修复和炎症因子的调节作用 [J]. 贵州医科大学学报, 2020, 45(12): 1426-1432.
- [30] 丘晓花, 刘霞, 钟平, 等. 3 种益生菌对抗生素相关性腹泻小鼠肠道乳酸杆菌数的影响 [J]. 广东医科大学学报, 2022, 40(4): 384-387.
- [31] 檀飞飞, 周中银. 双歧杆菌与肠道疾病及糖尿病的研究进展 [J]. 疑难病杂志, 2021, 20(2): 194-198.
- [32] 侯晓芹, 张桂华, 曹原, 等. 溃疡性结肠炎患者肠黏膜组织中 miR-24 的表达与肠道菌群和炎症因子的关系 [J]. 临床消化病杂志, 2022, 34(5): 338-342.
- [33] 于俊. 双歧杆菌对肉鸡生长性能、血清生化指标、肠道形态指标的影响 [J]. 饲料研究, 2023, 6: 33-37.
- [34] CHEN C, LI T, CHEN G, et al. Commensal relationship of three *Bifidobacterial* species leads to increase of *bifidobacterium in vitro* fermentation of sialylated immunoglobulin G by human gut microbiota [J]. Agric Food Chem, 2020, 68(34): 9110-9119.
- [35] 王燕飞, 刘璇, 张若男, 等. 复合益生菌对肉鸡肠道免疫、抗氧化与细胞凋亡的影响 [J]. 动物营养学报, 2023, 35(5): 2916-2928.