

益生菌滴剂对婴幼儿肠道菌群的调节作用及其健康效应

陈桔淳^{1,2}, 陆泽荣², 黄潘钿², 陈咏春², 赵飞², 张斌³, 胡瑞标³, 刘斐童^{2*}, 方祥^{1*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 合生元(广州)健康产品有限公司, 广东广州 510700) (3. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 以 16 名 6~24 月龄健康婴幼儿为研究对象, 该研究比较其食用含有长双歧杆菌婴儿亚种 R0033 和短双歧杆菌 M-16V 的益生菌滴剂 30 d 前后粪便中短链脂肪酸 (Short-Chain Fatty Acid, SCFA)、短链支链脂肪酸 (Branched-Chain Fatty Acid, BCFA)、肠道菌群组成和分泌型免疫球蛋白 A (Secretory Immunoglobulin A, sIgA) 含量变化, 评估益生菌滴剂对婴幼儿肠道健康的影响。结果表明, 食用后, 婴幼儿肠道关键代谢物 SCFA 含量尤其是乙酸含量显著增加 ($P<0.05$), 从 63.97 mmol/L 增加到 85.36 mmol/L; BCFA 含量从 1.86 mmol/L 显著增加到 4.80 mmol/L ($P<0.05$); 婴幼儿肠道微生物群落多样性无显著变化 ($P>0.05$), 但肠道菌群组成中在属水平上, *Lachnospirillum* 和粪芽孢菌 (*Coprococcus*) 相对丰度显著提高 ($P<0.05$); 在种水平上, 无害梭菌 (*Clostridium_innocuum*) 和 *Coprococcus cateniformis* 的相对丰度显著提高 ($P<0.05$), 长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*)、短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*)、两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*) 相对丰度有所增加但不具有统计学差异 ($P>0.05$); 粪便样本中 sIgA 含量无显著差异 ($P>0.05$)。综上, 食用益生菌滴剂 30 d 可以提高婴幼儿肠道中菌群代谢产物 SCFA 和 BCFA 的含量及有益菌的相对丰度, 有利于婴幼儿的肠道健康。

关键词: 益生菌滴剂; 婴幼儿; 短链脂肪酸; 肠道菌群; 分泌型免疫球蛋白 A

文章编号: 1673-9078(2025)05-19-27

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.5.0253

Gut Microbiome Regulation and Health Benefits of Probiotic Drops in Infants

CHEN Juchun^{1,2}, LU Zerong², HUANG Pantian², CHEN Yongchun², ZHAO Fei², ZHANG Bin³, HU Ruibiao³,
LIU Feitong^{2*}, FANG Xiang^{1*}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Biostime (Guangzhou) Health Products Limited, Guangzhou 510700, China)(3. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: To investigate the regulatory effects of probiotic drops on gut health and microbiota of infants, sixteen healthy volunteers aged 6 to 24 months were recruited and their diet was supplemented with probiotic drops containing

引文格式:

陈桔淳,陆泽荣,黄潘钿,等.益生菌滴剂对婴幼儿肠道菌群的调节作用及其健康效应[J].现代食品科技,2025,41(5): 19-27.

CHEN Juchun, LU Zerong, HUANG Pantian, et al. Gut microbiome regulation and health benefits of probiotic drops in infants [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(5): 19-27.

收稿日期: 2024-03-01

基金项目: 广东省省级科技计划项目 - 国际科技合作领域 (2023A0505050156)

作者简介: 陈桔淳 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品、菌群与健康, E-mail: 2498582144@qq.com

通讯作者: 方祥 (1971-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品、菌群与健康, E-mail: fxiang@scau.edu.cn; 共同通讯作者: 刘斐童 (1990-), 女, 博士, 高级工程师, 研究方向: 食品、菌群与健康, E-mail: erin.liu@hh.global

Bifidobacterium longum subsp. *infantis* R0033 and *B. breve* M-16V for 30 days. Their fecal short-chain fatty acid (SCFA) and branched-chain fatty acid (BCFA) contents, gut microbiota composition, and secretory immunoglobulin A were analyzed before and after the 30-day period of probiotic drop intake. The infants' fecal SCFA concentrations showed an increase (the acetic acid level increased significantly from 63.97 mmol/L to 85.36 mmol/L ($P<0.05$)). Their fecal BCFA concentration also increased significantly from 1.86 mmol/L to 4.80 mmol/L ($P<0.05$). There was no significant change in the diversity of gut microbiota ($P>0.05$). At the species level, the relative abundances of *Clostridium innocuum* and *C. cateniformis* showed significant increase ($P<0.05$), whereas the relative abundances of *B. longum*, *B. breve*, and *B. bifidum* were increased but not a level of statistical significance ($P>0.05$). At the genus level, the relative abundances of *Lachnospirillum* and *Coprotherobacter* showed significant increase ($P<0.05$). The fecal concentration of secretory immunoglobulin A showed no significant difference ($P>0.05$). In conclusion, 30-day intake of probiotic drops can increase the concentrations of SCFA and BCFA and the relative abundances of beneficial bacteria in the infant gut. Probiotic drops are thus beneficial to gut health of infants.

Key words: probiotic drops; infants; short-chain fatty acid; gut microbiota; secretory immunoglobulin A

人类肠道菌群在维持人体健康方面发挥着关键作用。生命早期肠道菌群的定殖与演变可以帮助宿主建立免疫耐受,预防过敏,加强肠道屏障,对致病细菌产生特异性免疫和抵抗病原微生物的入侵等^[1]。生命最初 1 000 天是肠道菌群建立的关键时期,其定殖及演变容易受到多种因素的影响而导致紊乱^[2]。

双歧杆菌是健康婴儿肠道最主要的优势菌群^[3]。双歧杆菌在婴儿肠道内的定殖,可抑制病原微生物在婴儿肠道内生长定殖,保护婴儿免受感染和促进免疫系统的发育成熟^[4,5]。近年来,抗生素的应用、母乳喂养率低而婴儿配方奶粉使用增多、剖腹产等因素使得婴儿肠道双歧杆菌的丰度降低或定植延迟,这可能会给婴幼儿带来许多不利的影响^[6-8]。研究显示母乳喂养儿在出生一个月内补充益生菌,益生菌干预组在 6~12 个月时双歧杆菌的相对丰度显著高于对照组且拟杆菌科、毛螺菌科的相对丰度较低,并且益生菌的干预可以使双歧杆菌稳定定殖^[9]。可见婴幼儿补充益生菌有利于肠道菌群的形成和发展,从而促进肠道健康^[2]。

目前我国食品安全标准与监测评估司公布的《可用于婴幼儿食品的菌种名单》有 14 株菌,其中只有一株属于短双歧杆菌即 M-16V 和一株属于长双歧杆菌婴儿亚种即 R0033,且短双歧杆菌和长双歧杆菌婴儿亚种是母乳喂养婴儿体内的优势菌群^[10]。然而目前尚无 M-16V 和 R0033 两株菌组合的研究及应用,将 M-16V 和 R0033 组合并应用于婴幼儿食品,研究其对婴幼儿肠道健康的影响具有重要的意义。因此,本研究旨在探究食用 30 d 含有长双歧杆菌婴儿亚种 R0033 和短双歧杆菌 M-16V 的益生

菌滴剂对 6~24 个月健康婴幼儿肠道菌群的调节作用及其健康效应。

1 材料与方法

1.1 材料

益生菌滴剂,包括中链甘油三酯(MCT,体积分数为 91.4%),短双歧杆菌 M-16V,长双歧杆菌婴儿亚种 R0033,单、双甘油脂肪酸酯,其活菌添加量为 400 亿 CFU/瓶(8 mL/瓶),由合生元(广州)健康产品有限公司提供;PBS P4417-100,购自美国 Sigma 公司;分泌型免疫球蛋白 A(sIgA)检测试剂盒 SEA641Hu,购自武汉云克隆科技股份有限公司;混合脂肪酸标准品溶液 46975-U,购自德国 Supelco 公司;DNA 提取试剂盒 D5625-01,购自美国 Omega 公司;Agencourt AMPure Beads,购自美国 Beckman 公司;PicoGreen dsDNA Assay Kit,购自美国 Invitrogen 公司;本研究中所使用的其他试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器设备

GR60DR 高压灭菌锅,美国 Zealway 公司;Microfuge 20R 冷冻离心机,美国 Beckman 公司;7890 气相色谱仪结合火焰离子检测器,美国 Agilent 公司;1260 LC 高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司;NanoDrop 2000C 超微紫外分光光度计,美国 Thermo fisher Scientific 公司;DYY-6C 电泳仪,北京六一公司;AUTO(130)凝胶成像系统,北京百晶公司;PacBio Sequel 测序平台,上海派森诺生物科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 志愿者招募和样品收集

在中国广州地区招募 6~24 月龄健康婴幼儿志愿者, 婴幼儿的监护人签署知情同意后, 研究者通过问卷收集志愿者的相关信息, 包括性别、月龄、健康状况、饮食信息和病史等。纳入标准: 1) 没有严重基础疾病者; 2) 两周内未使用过抗生素或药物; 3) 两周内未发生腹泻或便秘。志愿者每天食用益生菌滴剂 6~8 滴, 每天食用的益生菌总量约为短双歧杆菌 M-16V (1.0×10^9 CFU)、长双歧杆菌婴儿亚种 R0033 (6.0×10^9 CFU), 连续食用 30 d。食用前与连续食用 30 d 后, 监护人用无菌粪便取样管分别收集粪便 5 g, 并立即冷冻在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 随后转移至实验室并储藏于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 备用。本研究获得了广州市第一人民医院伦理委员会的批准 (批准号为 K-2021-091-01)。

1.3.2 粪便样本处理

将粪便样本用 PBS 溶液溶解混匀, 使得粪便匀浆体积分数为 10%, 在 12 000 r/min 下离心 10 min, 分别用无菌离心管收集上清液和菌体沉淀, 分别用于后续代谢产物的分析和肠道菌群组成分析。所有样品在分析前均储存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

1.3.3 SCFA 含量测定

SCFA 的产量测定参考徐诗琪等^[11]方法进行微量调整。使用气相色谱仪结合火焰离子检测器 7890 对样本的 SCFA 进行定量分析。室温下解冻上清液并于 12 000 r/min 下离心 10 min。将 120 μL 上清液与 30 μL 含有 4-甲基戊酸 (内标) 和偏磷酸的混合脂肪酸标准品溶液混合, 用 0.4 μm 无机水系滤膜滤过杂质, 将 0.2 μL 该混合溶液注入熔融石英毛细管柱 (Zebron, ZB-FFAP, 30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm)。升温程序如下: 初始柱温为 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 以 $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率升温至 $220\text{ }^{\circ}\text{C}$ 并保持 3 min。注射器和检测器的温度分别为 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $280\text{ }^{\circ}\text{C}$, 以氮气作为载气, 恒定流量为 1 mL/min。通过混合脂肪酸标准品的保留时间确定样品中每种 SCFA 的出峰位置, 根据检测样品与混合脂肪酸标准品中 SCFA 的相对峰面积进行定量分析。

1.3.4 乳酸和琥珀酸含量测定

参考 Ladirat 等^[12]的方法略作修改, 使用配有二极阵列检测器和 Rezex ROA-Organic Acid H+ 液相色谱柱 (300 $\times$ 7.8 mm) 的高效液相色谱仪检测上清液中乳酸和琥珀酸的含量。预先用超纯水分别配

制 1 mg/mL 的乳酸、琥珀酸和柠檬酸溶液 (内标)。取制备好的乳酸、琥珀酸和柠檬酸溶液各 50 μL 均匀混合, 以制得混合有机酸标准品溶液。室温下解冻上清液并在 12 000 r/min 下离心 10 min。取 100 μL 上清液与 50 μL 柠檬酸溶液混合并过无机水系滤膜。流动相为 5 mmol/L H_2SO_4 溶液, 使用前超声处理至少 30 min 以排除气泡, 流量为 0.5 mL/min, 柱温箱温度设置为 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。将 100 μL 上清液与 50 μL 柠檬酸内标溶液混合, 然后将 10 μL 该混合溶液注入色谱柱。通过混标溶液的保留时间确定样品中乳酸和琥珀酸的出峰位置, 根据检测样品与混合有机酸标准品中乳酸和琥珀酸的相对峰面积来进行定量分析。

1.3.5 sIgA 的测定

使用 sIgA 检测试剂盒根据说明书运用双抗体夹心 ELISA 法定量测定粪便中 sIgA 含量。

1.3.6 DNA 提取及 16S rRNA 全长测序

使用 DNA 提取试剂盒提取每个婴儿的粪便中微生物的基因组总 DNA。在进行进一步分析前将所提 DNA 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中储存。分别使用 NanoDrop ND-2000 分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的浓度和纯度。使用正向引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 和反向引物 1492R (5'-ACCTTGTTACGACTT-3') 对细菌 16S rRNA 全长基因进行聚合酶链反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 扩增。采用两步法 PCR 扩增, 在第二步中, 将样品特异性 16 bp 条形码纳入正向和反向引物, 用于多重测序。PCR 扩增子用 Agencourt AMPure Beads 进行纯化, 并使用 PicoGreen dsDNA Assay Kit 进行定量。在完成单独的定量步骤之后, 扩增子被汇集成相等的量, 使用 PacBio Sequel 平台进行单分子实时测序和双端测序。原始序列最初通过 PacBio SMRT Link 门户进行处理 (版本 5.0.1.9585)。

1.3.7 生物信息学分析

采用 DADA2 方法进行去重, 去重后的序列称为特征序列 (Amplicon Sequence Variant, ASV)。以 ASV 为分类单元, 通过 Greengenes 数据库比对确定分类学注释结果。使用 QIIME2 (2019.4) 和 R 软件包 (v3.2.0) 进行序列数据验证及定量分析。借助基因云平台进行数据可视化和绘制 (<https://www.genescloud.cn/login>)。

1.3.8 数据统计与分析

用 IBM SPSS Statistics 26.0 版对数据进行统计分析并使用 GraphPad Prism 6.01 版进行可视化。数

据以平均值 ± 标准差表示。采用配对样本 *t* 检验进行数据的显著性分析，其中 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 纳入志愿者信息

本研究招募了 24 位志愿者，经过纳入标准筛选及排除：1) 研究过程中服用抗生素 / 药物；2) 服用其他益生菌；3) 未坚持服用。最终共纳入了 16 位健康婴幼儿受试者，志愿者的基础信息如下表 1 所示，志愿者年龄为 6~24 月龄，其中 9 位为 18~24 月龄，性别以男生为主（75%），生产方式主要为顺产（88%），大多数志愿者为配方奶喂养（69%），且全部志愿者已经添加辅食，近两周内未使用药物或抗生素，近两周内未发生过腹泻或便秘。

表 1 志愿者基础信息

Table 1 Volunteer information				
组别	例数	性别		月龄
		男	女	
食用前	24	17	7	17.19 ± 8.87
食用后	16	12	4	17.00 ± 5.31

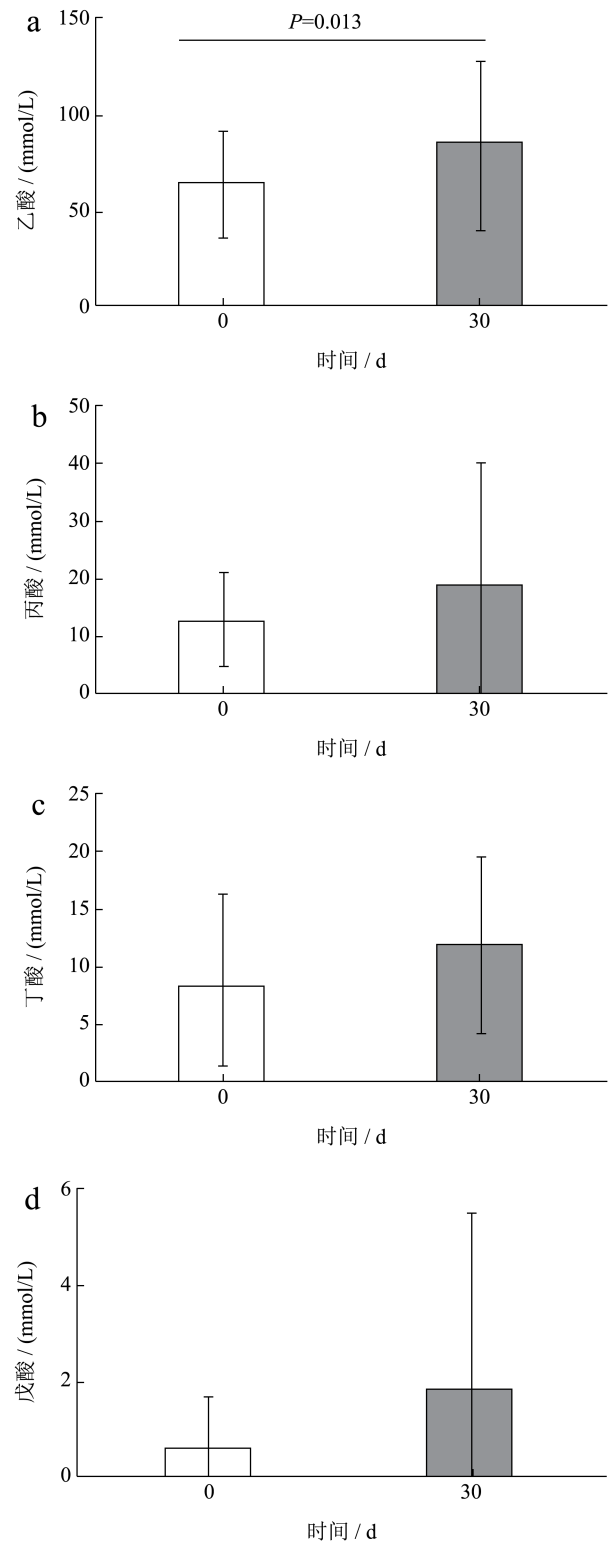
2.2 益生菌滴剂干预前后婴幼儿肠道SCFA和乳酸及琥珀酸含量变化

为研究食用含长双歧杆菌婴儿亚种 R0033 和短双歧杆菌 M-16V 的益生菌滴剂 30 d 后对婴幼儿肠道关键代谢产物的影响，对婴幼儿粪便中乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、乳酸和琥珀酸的含量进行了定量分析，如图 1 所示。分析发现益生菌滴剂干预 30 d 后，粪便中乙酸含量显著增加 ($P=0.013$)，从 63.97 mmol/L 增加至 85.36 mmol/L 且在总 SCFA 中占比最高。此前有学者^[13]报道了 6~19 周龄健康婴儿食用含有 M-16V 和益生元的奶粉 6 周后，婴儿肠道 SCFA 中的乙酸含量最高且含量显著增加，这与本次研究结果一致。

丙酸、丁酸、戊酸含量分别从 12.25、8.12、0.56 mmol/L 增加至 18.73、11.85、1.80 mmol/L，但无统计学差异，这与 Kosuwon 等^[14]的研究结果类似，其研究显示 1~3 岁的幼儿食用含有益生元的 M-16V 配方粉 12 周后，幼儿肠道中的乙酸、丙酸、丁酸和总的 SCFA 的含量有所增加但均无显著性。

乳酸含量从 5.78 mmol/L 减少至 3.58 mmol/L，琥珀酸含量从 21.89 mmol/L 增加至 23.55 mmol/L，但无统计学差异。而 SCFA 总量显著增加 ($P=0.027$)，

从 86.76 mmol/L 增加至 122.54 mmol/L。SCFA 是肠上皮细胞的重要能量来源，可以通过不同机制调节肠上皮细胞的增殖、分化以及肠内分泌细胞等亚群的功能，影响肠道运动，增强肠道屏障功能和宿主代谢^[15]。同时 SCFA 还具有重要的免疫调节功能^[16]。因此，肠道中 SCFA 总量增加有利于婴幼儿的肠道健康和免疫发育。



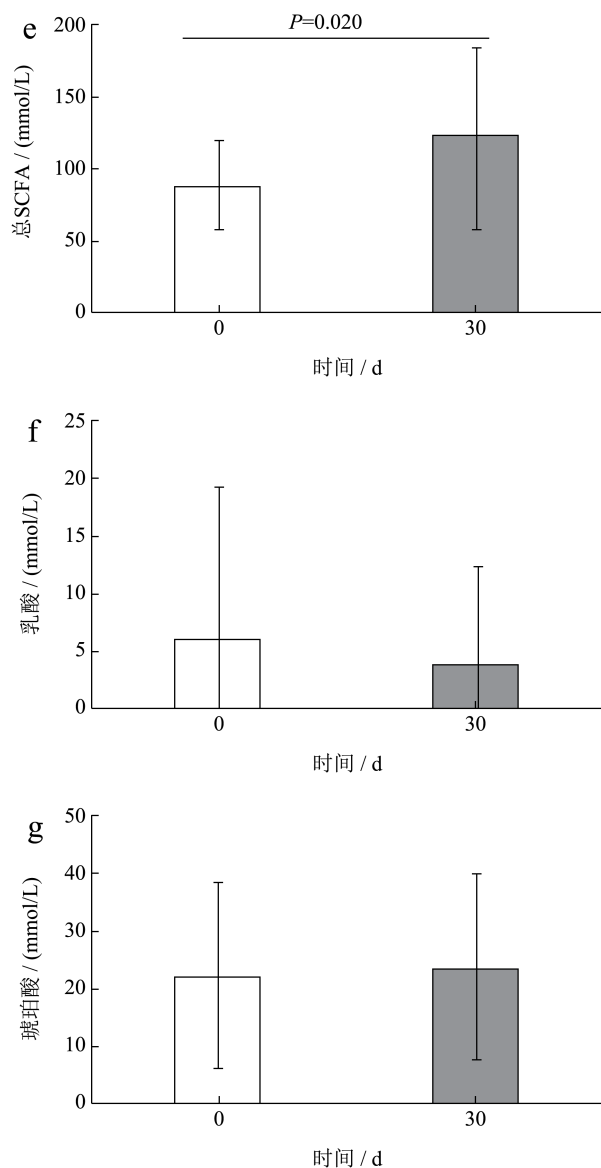


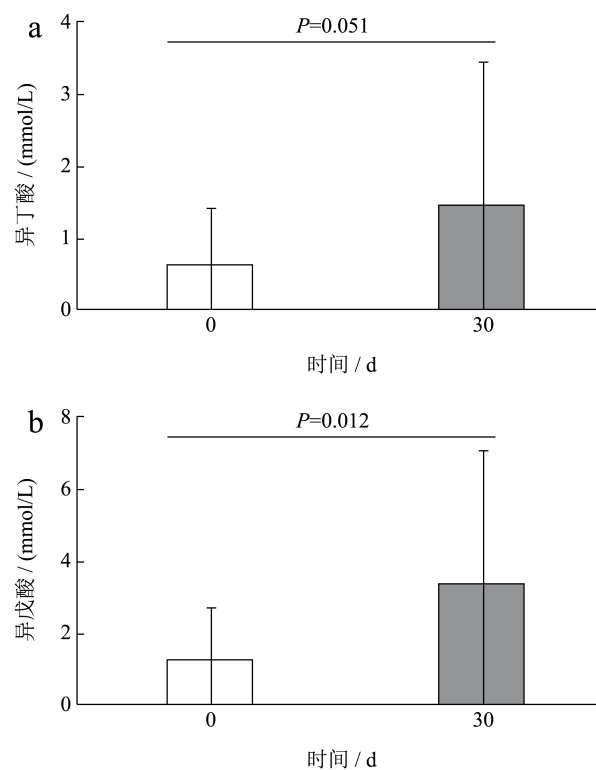
图1 益生菌滴剂干预前后婴幼儿肠道 SCFA 和乳酸及琥珀酸含量变化

Fig.1 Changes of SCFA, lactic acid and succinic acid concentration before and after 30 days of probiotic intervention

2.3 益生菌滴剂干预前后婴幼儿肠道BCFA含量变化

益生菌滴剂干预 30 d 后婴幼儿肠道中 BCFA 含量变化如图 2 所示, 其中异丁酸的含量增加, 从 0.63 mmol/L 增加到 1.44 mmol/L ($P=0.051$); 异戊酸含量显著增加, 从 1.23 mmol/L 增加到 3.35 mmol/L ($P=0.012$); 总 BCFA 含量显著增加, 从 1.86 mmol/L 增加到 4.80 mmol/L ($P=0.018$)。当可发酵碳水化合物供应减少时, 一些细菌种类可以转向蛋白质发酵作为替代能源, 产生 SCFA, 同时还会产生 BCFA

包含异丁酸和异戊酸, 浓度相比于 SCFA 低很多^[17]。本研究发现益生菌滴剂干预后婴幼儿肠道中的 BCFA 的含量显著增加, 有可能和益生菌滴剂中未包含如低聚果糖、低聚半乳糖等可以被肠道菌群利用的碳水化合物有关。经深入分析发现, 纳入的婴幼儿由于在干预周期内, 辅食含量的添加, 可能在食用益生菌滴剂期间通过辅食摄入的蛋白质增多, 使得菌群代谢物中异丁酸和异戊酸的含量升高。异丁酸和异戊酸是人类便细菌发酵支链氨基酸缬氨酸和亮氨酸产生的^[17]。正常饮食状态下进入结肠的碳水化合物含量远远高于蛋白质, 因此肠道中异丁酸和异戊酸含量相对较低, 目前对于其对宿主健康的影响研究较少, 大多为体外研究。研究表明, 当丁酸盐利用率不足时, 异丁酸盐是结肠细胞的潜在能量来源^[18]。异丁酸可以显著抑制人结肠癌细胞株 (DLD-1 细胞、WirDr 细胞) 的活性, 对结直肠癌的发生可能具有抑制作用^[19]。异丁酸和异戊酸能够调节脂肪细胞脂质和糖代谢, 有助于改善代谢紊乱个体的胰岛素敏感性^[20]。也有学者利用体外细胞模型研究发现, 异丁酸、异戊酸能够增加肠道通透性, 在人体健康中有可能起到反向作用^[21]。对于异丁酸和异戊酸对人体健康的影响还需要更多的研究来进一步验证。



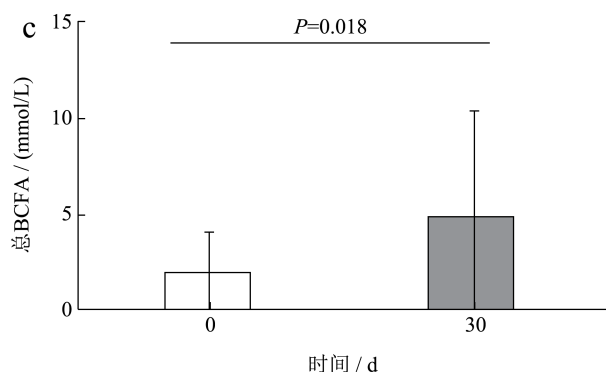


图2 益生菌滴剂干预前后婴幼儿肠道 BCFA 含量变化

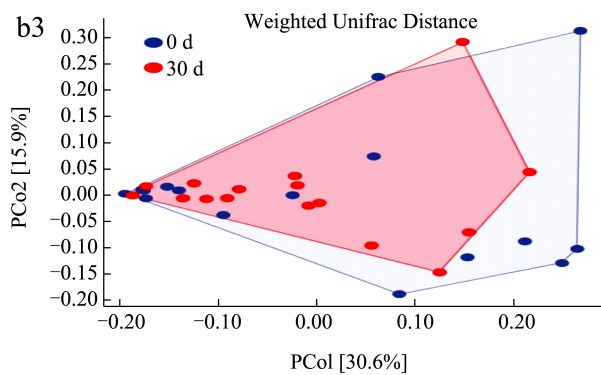
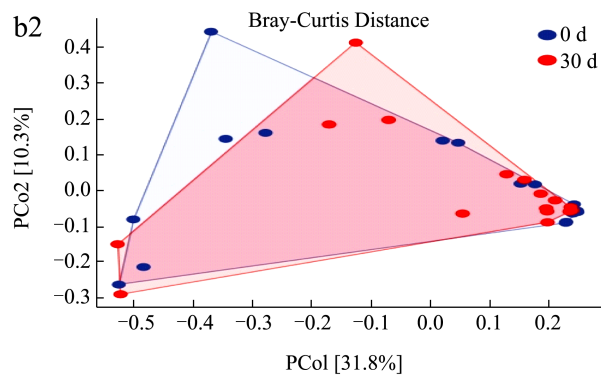
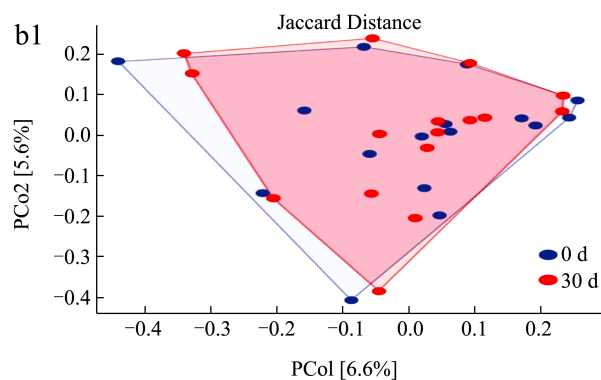
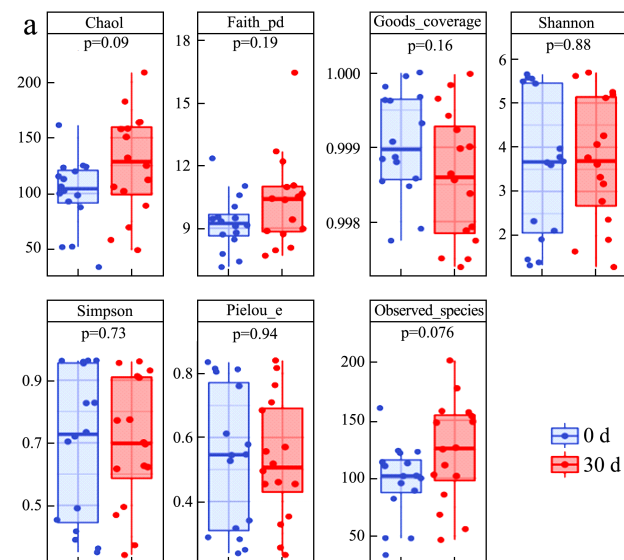
Fig.2 Changes of BCFA concentration before and after 30 days of probiotic intervention

2.4 益生菌滴剂干预前后婴幼儿肠道菌群结构多样性分析

为了评估食用益生菌滴剂 30 d 后对婴幼儿肠道微生物群落多样性的影响, 使用 α 多样性和 β 多样性 (分别表征物种在生境内和生境间的多样性) 来综合评价其总体多样性变化。

Chao 1、Observed species、Shannon、Simpson、Faith's PD、Pielou's evenness、Good's coverage 指数通常用于全面评估微生物群落的 α -多样性。图 3a 展示的是婴幼儿服用滴剂 30 d 前后肠道微生物群落各种 α -多样性指数的比较。使用 Good's Coverage 指数来分析每组样品的测序覆盖率, 数据显示各组的测序覆盖率均达到 99.7% 以上, 结果表明本研究中的测序序列代表了生境中 99.7% 以上的细菌种系型, 样品序列未被检测到的可能性较低, 覆盖率好。用 Pielou's evenness 指数分析均匀度, 数据显示, 两组的均匀度没有显著性差异。用 Chao1 和 Observed species 指数分析丰富度, Shannon 和 Simpson 指数分析多样性, Faith's PD 指数分析基于进化的多样性, 各指数数值越大, 即群落的多样性程度越高。统计分析发现, 各指数之间均没有显著差异 ($P>0.05$), 表明经益生菌滴剂干预 30 d 后, 婴幼儿肠道菌群的多样性未发生显著变化。为了描述食用益生菌滴剂前后粪便样本之间菌群组成的相似性, 采用常用的 β 多样性距离如 Jaccard 距离, Bray-Curtis 距离, unweighted UniFrac 距离和 weighted UniFrac 距离等进行计算, 形成样本差异距离矩阵, 基于这些距离矩阵进行主坐标分析 (Principal Coordinates Analysis, PCoA) 并使其可视化, 结果如图 3b 所示, 可以看出, 食用益生菌滴剂 30 d 前后粪便样本中微生物群落不

能明显分开, 菌群组成具有一定的相似性。



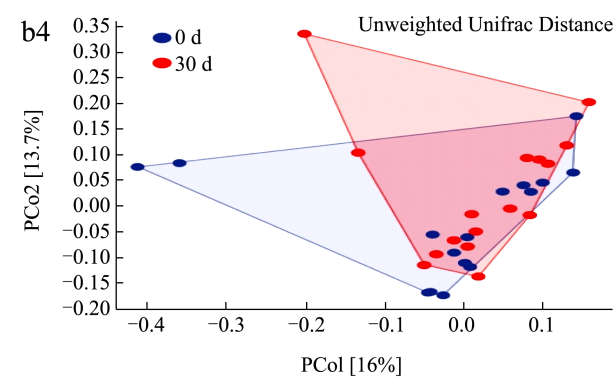


图 3 肠道菌群结构多样性分析图

Fig.3 Structural diversity analysis of intestinal microbiota
注：(a) 益生菌滴剂干预前后婴幼儿肠道菌群 α 多样性分析图；(b) 益生菌滴剂干预前后婴幼儿肠道菌群 PCoA 分析图

Andrés 等^[22]曾纳入 23 名 3~12 个月的婴儿进行研究，其发现每天食用 3.0×10^9 CFU 的 R0033 菌粉，8 周后婴儿肠道菌群结构多样性指数 shannon 指数在干预前后也没有显著性差异。推测粪便样本 alpha 多样性和 beta 多样性未发生显著变化可能是因为益生菌的补充时间过短且健康的肠道菌群具有一定的稳定性和恢复力，短期内可能不会表现出显著的多样性变化^[23]。

2.5 益生菌滴剂干预前后婴幼儿肠道菌群的组成变化和LEfSe分析

通过 16S rRNA 全长基因测序分析婴幼儿食用益生菌滴剂 30 d 前后肠道菌群在种水平的组成及相对丰度变化，如图 4 所示。可以看出，益生菌滴剂干预 30 d 后，与未干预前对比，婴幼儿肠道菌群中活泼瘤胃球菌（[*Ruminococcus*] *gnavus*）的相对丰度显著提高了（ $P<0.05$ ），从 2.02% 提升至 4.20%。活泼瘤胃球菌编码的胞外岩藻糖苷酶会启动 2'-岩藻糖基乳糖的分解，对短双歧杆菌生长发挥着重要作用^[24]。*Bifidobacterium longum*、*Bifidobacterium breve*、*Bifidobacterium bifidum* 相对丰度增加，分别从 0.69%、0.19% 和 0.08% 升至 1.47%、1.26% 和 0.28%；丁酸主要产生菌假小链双歧杆菌（*Bifidobacterium pseudocatenulatum*）和普氏粪杆菌（*Faecalibacterium prausnitzii*）相对丰度也有所增加，分别从 0.56% 和 0.15% 升至 0.59% 和 0.85%。然而，这些菌种相对丰度的增加并不显著。

本研究中，R0033 菌粉的干预量为每天 6.0×10^7 CFU，干预 30 d 后婴幼儿肠道双歧杆菌丰

度并没有发生显著性变化，Andrés 等^[22]的临床研究纳入了 23 名 3~12 个月的婴儿每天食用 3.0×10^9 CFU 的 R0033 菌粉，8 周后婴儿肠道菌群中双歧杆菌在属和种水平的丰度没有发生显著性变化。

另前期有关于短双歧杆菌 M-16V 的多个临床研究，但均与益生元短链低聚半乳糖和长链低聚果糖一同食用，如 Kosuwon 等^[14]发现 1~3 岁的幼儿连续食用 12 周含有 M-16V 1.8×10^7 CFU/g 和 0.95 g/100 mL 短链低聚半乳糖和长链低聚果糖的奶粉，双歧杆菌属水平显著提升；Phavichitr 等^[13]研究发现 6~19 周龄健康婴儿喂养含有 M-16V 和短链低聚半乳糖与长链低聚果糖的奶粉 6 周，M-16V 每日摄入量为 1.0×10^9 CFU，可以提升婴儿肠道中双歧杆菌种水平，本研究 M-16V 的每日食用量也约为 1.0×10^9 CFU，干预 30 d 后双歧杆菌种水平相对丰度有所增加但无显著性，推测这可能跟干预周期较短及益生菌滴剂中未含有低聚果糖或低聚半乳糖等可被双歧杆菌利用的益生元有关。

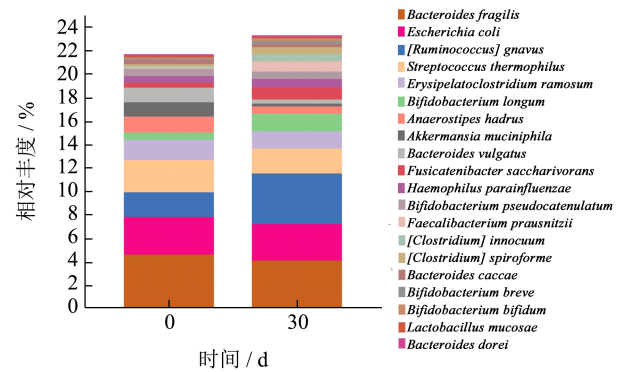


图 4 益生菌滴剂干预前后婴幼儿肠道菌群种水平的组成变化
Fig.4 Changes in the composition of intestinal microbiota at the species level before and after probiotic drops intervention

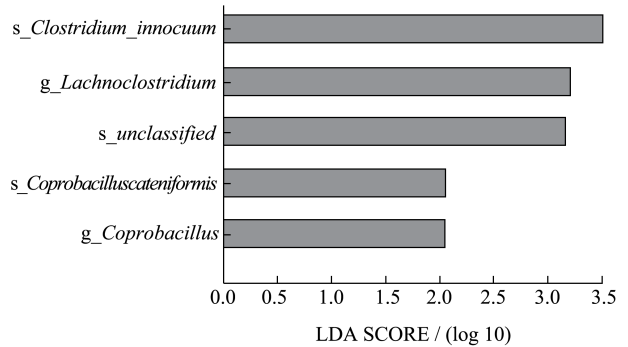


图 5 益生菌滴剂干预前后肠道菌群发生显著变化的种属分析-LEfSe 分析
Fig.5 Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) analysis of the different intestinal microbiota before and after probiotic drops intervention

进一步地,采用线性判别分析(Linear Discriminant Analysis Effect Size, LEfSe)比较食用益生菌滴剂30 d前后在丰度上有显著差异的属和种。如图5所示,食用益生菌滴剂30 d后婴幼儿肠道菌群组成在属水平上,*Lachnoclostridium*和*Coprobacillus*相对丰度显著高于未食用前;在种水平上,*Clostridium_innocuum*和*Coprobacillus cateniformis*的相对丰度显著高于未食用前。*Lachnoclostridium*属是革兰氏阳性菌,专性厌氧,其包含了XIVa梭状芽胞杆菌(*Clostridium XIVa*),而*Clostridium XIVa*是人类肠道微生物群的重要组成部分,具有抗炎的作用,它的代谢物尤其是丁酸盐对肠道健康有着重要的作用^[25]。同时另一丰度显著升高的菌属*Coprobacillus*有文献报道其具有抗炎的作用^[26]。*Clostridium_innocuum*是正常肠道菌群的组成部分^[27]。另一个丰度显著升高的*Coprobacillus cateniformis*,有学者在动物模型验证其跟动物血清中瘦素含量呈正相关,可能具有抗肥胖效果^[28],可能有利于预防婴幼儿肥胖。因此,食用益生菌滴剂可能通过调节肠道菌群的组成从而对健康产生影响,具体的健康效应需要进一步的研究进行验证。

2.6 益生菌滴剂干预前后婴幼儿肠道sIgA含量变化

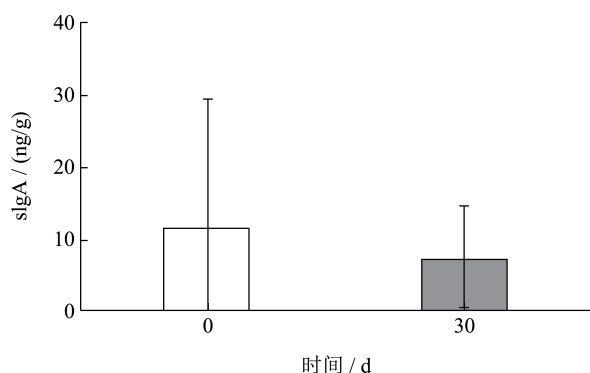


图6 益生菌滴剂干预前后婴幼儿肠道分泌型免疫球蛋白A(sIgA)含量变化

Fig.6 Changes of secreted immunoglobulin A (sIgA) content before and after probiotic drops intervention

婴儿时期肠道微生物群和肠道内sIgA之间的相互作用对未来的健康非常重要,sIgA是肠道内的主要免疫球蛋白,存在于肠道黏膜表面,能靶向细菌表面的多糖和鞭毛蛋白,形成sIgA包被细菌,从而阻止它们与宿主上皮细胞直接接触^[29,30]。研究显示,双歧杆菌可以诱导肠道中高浓度的sIgA^[31]。为了探究食用益生菌滴剂30 d对婴幼儿肠道中sIgA分泌的影响,

采用ELISA试剂盒测定食用前后粪便样本中sIgA的含量,测定结果如图6所示,食用前含量为10.63 ng/g,食用后含量为7.87 ng/g,但没有发现有统计学差异。双歧杆菌对sIgA的诱导可能存在菌株差异,Laurent等^[32]用含短双歧杆菌C50和嗜热链球菌ST065的婴儿配方奶粉干预刚出生的婴儿6个月也未能显著增加健康婴儿粪便总sIgA的浓度。此外,有研究报道随着婴幼儿年龄的增长,粪便中的IgA水平会显著下降^[33],而此次参与研究的婴幼儿月龄较大,这可能是造成本次婴幼儿粪便中sIgA含量有下降趋势的原因。

3 结论

本研究主要发现6~24月龄婴幼儿食用含有长双歧杆菌婴儿亚种R0033和短双歧杆菌M-16V的益生菌滴剂30 d可以提高婴幼儿肠道关键代谢产物SCFA的含量,尤其是乙酸的含量显著增加;BCFA含量也显著增加;婴幼儿肠道微生物群落多样性未发生显著变化;肠道菌群组成中活泼瘤胃球菌相对丰度显著增加,双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*和*Bifidobacterium bifidum*)丰度有所增加;在菌属水平上,*Lachnoclostridium*和*Coprobacillus*相对丰度显著高于未食用前;在菌种水平上,*Clostridium_innocuum*和*Coprobacillus cateniformis*的相对丰度显著高于未食用前;粪便样本中sIgA含量在服用前后没有显著性差异。综上,食用益生菌滴剂30 d可以提高婴幼儿肠道中菌群代谢产物SCFA和BCFA的含量及有益菌的相对丰度,有利于婴幼儿的肠道健康。

参考文献

- [1] MARIE C A, LEAH T S, NELLY A, et al. The intestinal microbiome in early life: health and disease [J]. *Frontiers in immunology*, 2014, 5: 427.
- [2] 郑跃杰. 婴幼儿肠道菌群和益生菌新进展[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018.
- [3] MATTHEW R O, DYLAN D, MATTHEW, et al. Robust variation in infant gut microbiome assembly across a spectrum of lifestyles [J]. *Science*, 2022, 376(6598): 1220-1223.
- [4] YAN W L, LUO B L, ZHANG X Y, et al. Association and occurrence of *Bifidobacterial* phylotypes between breast milk and fecal microbiomes in mother-infant dyads during the first 2 years of life [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 669442.

- [5] 荫士安,人乳成分:存在形式、含量、功能、检测方法[M].北京:化学工业出版社,2016
- [6] KATARIINA M M P, JENNI H, MELINA M, et al. Early-life formula feeding is associated with infant gut microbiota alterations and an increased antibiotic resistance load [J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2022, 115(2): 407-421.
- [7] LUCY M D, ALEXANDER G, MARK A, et al. Association between antibiotics and gut microbiome dysbiosis in children: systematic review and meta-analysis [J]. Gut Microbes, 2021, 13(1): 1-18.
- [8] KATRI K, ANNE S, OUTI V, et al. Probiotic supplementation restores normal microbiota composition and function in antibiotic-treated and in caesarean-born infants [J]. Microbiome, 2018, 6(1): 182.
- [9] OBRIEN C E, MEIER A K, CERNIOGLO K, et al. Early probiotic supplementation with *B.infantis* in breastfed infants leads to persistent colonization at 1 year [J]. Pediatric Research, 2022, 91(3): 627-636.
- [10] SAUMYA W, ALLINE R P, DANIELLE G L, et al. Bifidobacteria grown on human milk oligosaccharides downregulate the expression of inflammation-related genes in Caco-2 cells [J]. BMC Microbiology, 2015, 15: 172.
- [11] 徐诗琪,周倩雯,扶雄,等.高链玉米淀粉-不饱和脂肪酸复合物的体外大肠发酵特性及其对肠道菌群的影响规律[J].现代食品科技,2023,39(1):20-30.
- [12] STEPHANIE E L, FRANK H J S, MARGRIET H C S, et al. Impact of galacto- oligosaccharides on the gut microbiota composition and metabolic activity upon antibiotic treatment during *in vitro* fermentation [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2014, 87(1): 41-51.
- [13] NOPAORN P, WANG S G, SIRINUCH C, et al. Impact of synbiotics on gut microbiota during early life: a randomized, double-blind study [J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 3534.
- [14] P K, M L A, S U, et al. A synbiotic mixture of scGOS/lcFOS and Bifidobacterium breve M-16V increases faecal Bifidobacterium in healthy young children [J]. Beneficial Microbes, 2018, 9(4): 541-552.
- [15] CAMILLE M G, LUDOVICA M, HERVE M B, et al. SCFA: mechanisms and functional importance in the gut [J]. Proceedings of the Nutrition Society, 2021, 80(1): 37-49.
- [16] 朱晓振,张茵茵,孟现尧,等.短链脂肪酸改善2型糖尿病小鼠胰岛素抵抗和胰腺损伤[J].现代食品科技,2020,36(8): 1-7.
- [17] E A S, G T M. Dissimilatory amino acid metabolism in human colonic bacteria [J]. Anaerobe, 1997, 3(5): 327-337.
- [18] JERZY J, ZHAO Y, JOHN W H, et al. Catabolism of isobutyrate by colonocytes [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1996, 327(2): 265-270.
- [19] TADASHI O, TATSUO S. Intake of *Bifidobacterium longum* and fructo-oligosaccharides prevents colorectal carcinogenesis [J]. Euroasian Journal of Hepato-gastroenterology, 2018, 8(1): 11-17.
- [20] EMILIA H, MARGARETA N, ANN K P, et al. Branched short-chain fatty acids modulate glucose and lipid metabolism in primary adipocytes [J]. Adipocyte, 2016, 5(4): 359-368.
- [21] 张小芳,王欣,汪惠勤,等.人体肠道菌群代谢氨基酸产生短链脂肪酸及对细胞通透性的影响[J].中国食品学报, 2021,21(7):60-67.
- [22] J D A, S M, C G, et al. Modulatory effect of three probiotic strains on infants' gut microbial composition and immunological parameters on a placebo-controlled, double-blind, randomised study [J]. Beneficial Microbes, 2018, 9(4): 573-584.
- [23] LIANG Y M, YAO X M, MENG Z D, et al. Gut microbial network signatures of early colonizers in preterm neonates with extrauterine growth restriction [J]. BMC Microbiology, 2024, 24(1): 82.
- [24] YUE C L, BENJAMIN E R, MARIE C S, et al. Infant microbiome cultivation and metagenomic analysis reveal *Bifidobacterium* 2'-fucosyllactose utilization can be facilitated by coexisting species [J]. Nature Communications, 2023, 14: 7417.
- [25] I D, H A, L H, et al. Genome analysis of *Lachnoclostridium phocaeense* isolated from a patient after kidney transplantation in Marseille [J]. New Microbes and New Infections, 2021, 41: 100863.
- [26] ZHANG S F, ZHONG R Q, TANG S L, et al. Baicalin alleviates short-term lincomycin-induced intestinal and liver injury and inflammation in infant mice [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(11): 6072.
- [27] CHRISTA M, WILLI E H, KLAUS D W. *Clostridium innocuum*: a glucoseureide-splitting inhabitant of the human intestinal tract [J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1472(3): 550-554.
- [28] TANG D, WANG Y H, KANG W Y, et al. Chitosan attenuates obesity by modifying the intestinal microbiota and increasing serum leptin levels in mice [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 64: 103659.
- [29] BRIAN J U, J M S. Immunoglobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface [J]. Annual Review of Immunology, 1986, 4: 389-417.
- [30] STOKES C R, SOOTHILL J F, TURNER M W. Immune exclusion is a function of IgA [J]. Nature, 1975, 255(5511): 745-746.
- [31] H Y, N N, A M, et al. Detection of *Bifidobacterium* strains that induce large quantities of IgA [J]. Microbial Ecology in Health and Disease, 2009, 5(3): 155-162.
- [32] LAURENT B, SEBASTIAN T, MIEKE R, et al. Fermented infant formula (with *Bifidobacterium breve* C50 and *Streptococcus thermophilus* O65) with prebiotic oligosaccharides is safe and modulates the gut microbiota towards a microbiota closer to that of breastfed infants [J]. Clinical Nutrition, 2021, 40(3): 778-787.
- [33] ANDERS J, JULIA K G, OMRY K, et al. Interactions between the gut microbiome and mucosal Immunoglobulins A, M, and G in the developing infant gut [J]. mSystems, 2019, 4(6): e00612-19.