

屎肠球菌 B21 对高脂饮食 Wistar 大鼠体重、空腹血糖和粪便菌群的影响

王严¹, 杨静¹, 邵则淮¹, 蒋惠男², 张江², 陈兰明^{1,*}

(1.农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估重点实验室(上海),上海海洋大学食品学院,上海 201306;

2.上海市农林职业技术学院动物科学技术系,上海 201699)

摘要:本研究分析了摄食屎肠球菌(*Enterococcus faecium*) B21 菌株对高脂饮食 Wistar 大鼠体重和空腹血糖的影响;并运用高通量测序技术分析大鼠肠道菌群多样性的变化。36 只 Wistar 大鼠随机分为正常对照组(NCD)、高脂饮食组(HFD)和 *E.faecium* B21 干预组(HFD + B21)。NCD 组大鼠喂食普通饲料,HFD 组和 HFD + B21 组大鼠喂食高脂饲料。自第 1 周起,给予 HFD + B21 组每只大鼠每天灌胃 0.2 mL *E.faecium* B21(10^8 CFU/mL)至第 7 周。收集第 7 周大鼠粪便,通过高通量测序分析了 3 组大鼠肠道菌群的结构和组成。结果表明:在第 7 周时,HFD + B21 组(366.51 g)大鼠体重显著高于 HFD 组(339.43 g, $p < 0.05$)和 NCD 组(306.84 g, $p < 0.05$),HFD + B21 组大鼠(7.63 mmol/L)空腹血糖显著低于 HFD 组(8.75 mmol/L, $p < 0.05$),且与 NCD 组无显著性差异(7.08 mmol/L, $p > 0.05$)。HFD + B21 组大鼠肠道菌群丰度(ACE 值 398.12, Chao1 值 398.49)和多样性最低(Shannon 指数 3.83),NCD 组菌群丰度(ACE 值 700.57, Chao1 值 698.07)和多样性(Shannon 指数 5.06)最高;*E.faecium* B21 的摄入降低了菌群中致病菌属假单胞菌属(*Pseudomonas*)和脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)的比率,同时促进了有益菌属布劳特氏菌属(*Blautia*)的增长。结论:*E.faecium* B21 的摄入能促进高脂饮食 Wistar 大鼠的体重,降低其空腹血糖且对肠道菌群失衡具有一定的调节作用。

关键词:屎肠球菌 B21, 体重, 空腹血糖, 肠道菌群, 高通量测序

Effects of *Enterococcus faecium* B21 on Body Weight, Fasting Blood Glucose Levels, and Fecal Bacterial Communities of Wistar Rats Fed by High Fat Diet

WANG Yan-yan¹, YANG Jing¹, SHAO Ze-huai¹, JIANG Hui-nan², ZHANG Jiang², CHEN Lan-ming^{1,*}

(1.Laboratory of Quality&Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservation(Shanghai), Ministry of Agriculture, College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2.Department of Animal Science, Shanghai Vocational College of Agriculture and Forestry, Shanghai 201699, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the effects of *Enterococcus faecium* B21 on body weight, fasting blood glucose levels, and fecal bacterial communities of high fat diet(HFD)-treated Wistar rats. Thirty-six Wistar rats were randomly divided into three groups, including the normal chow-diet(NCD) group, HFD group, HFD and *E.faecium* B21(HFD + B21) group. Each rat in the HFD + B21 group was fed with 0.2 mL *E.faecium* B21 (10^8 CFU/mL) each day. After the intragastric administration for 7 weeks, the feces of the rats were collected, and their fecal bacterial communities were detected by high-throughput sequencing of bacterial 16S rRNA gene. The results showed that body weight of the rats in the HFD + B21 group(366.51 g) were increased significantly compared with those in the groups HFD(339.43 g, $p < 0.05$) and NCD(306.84 g, $p < 0.05$), and the fasting blood glucose levels of rats in the HFD + B21 group(7.63 mmol/L) were reduced significantly compared with those in the HFD group(8.75 mmol/L, $p < 0.05$) and there was no significant difference compared with those in the NCD group(7.08 mmol/L, $p > 0.05$). The HFD + B21 group had the lowest bacterial abundance(ACE-index 398.12, Chao1-index 398.49) and diversity(Shannon index 3.83), while the NCD group had the highest abundance(ACE-index 700.57, Chao1-index 698.07) and diversity(Shannon index 5.06). The results also displayed that the intake of *E.faecium* B21 increased the ratios of probiotics *Blautia* in the bacterial population, and inhibited the growth of pathogenic bacteria *Pseudomonas* and *Desulfovibrio*. These results suggested that *E.faecium* B21 had a hypoglycemic effect and regulated the imbalance of intestinal bacterial population in Wistar rats caused by the intake of HFD.

收稿日期:2017-12-29

作者简介:王严(1990-),女,硕士,研究方向:食品微生物,E-mail:wangyy901010@163.com。

*通讯作者:陈兰明(1965-),女,博士,教授,研究方向:食品安全与质量控制,E-mail:lmchen@shou.edu.cn。

基金项目:上海市科委项目(B-9500-10-0004)。

Key words: *Enterococcus faecium* B21; body weight; fasting blood glucose levels; fecal microbiota; high-throughput sequencing
中图分类号: TS201.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-0306(2018)17-0276-07
doi:10.13386/j.issn1002-0306.2018.17.046
引文格式: 王严严, 杨静, 邵则淮, 等. 屎肠球菌 B21 对高脂饮食 Wistar 大鼠体重、空腹血糖和粪便菌群的影响[J]. 食品工业科技, 2018, 39(17): 276-282.

乳酸菌是公认的益生菌, 具有降低宿主血糖、免疫调节、维持肠道菌群平衡等健康促进作用^[1-3]。屎肠球菌(*E. faecium*)是隶属于肠球菌属(*Enterococcus*)的益生乳酸菌, 具有一定的益生功效^[4]。

目前, 国内外有关屎肠球菌促进实验动物(仔猪或鼠类)生长、提高免疫力和改善肠道菌群的研究已取得一定进展。例如, 黄怡^[5]研究发现, *E. faecium* EF1 菌株的摄入能够促进仔猪生长, 并提高宿主的免疫力; 丁爽等^[6]研究发现, *E. faecium* B13 能够维持仔猪肠道中的菌群稳态, 遏制致病微生物的生长; Annette Zeyner 等^[7]研究发现, 口服 *E. faecium* DSM 10663 NCIMB 10415 可促进未断奶仔猪每日体重的增长并减少腹泻的发生。王永^[8]研究发现, 仔猪饲料中添加 *E. faecium* B-1 微胶囊制剂可以改善仔猪生长性能, 维持肠道微生态平衡, 增强免疫力。然而, 屎肠球菌对宿主血糖调节作用的研究鲜有报道。

在前期研究中, 本实验室从中国传统发酵食品中分离、鉴定、保存了 *E. faecium* B21 菌株^[9]。体外益生菌功能评价结果显示, 该菌株对人工肠液和人工胃液具有较好的耐受性^[10], 说明 *E. faecium* B21 可以在宿主胃肠极端环境中生存, 从而在肠道中定殖, 发挥益生功能。在前期研究基础上, 本实验主要分析 *E. faecium* B21 菌株的摄入对高脂饮食 Wistar 大鼠体重、空腹血糖和肠道菌群多样性的影响, 评价其在宿主体内的益生作用, 为屎肠球菌应用于动物养殖业以及开发降血糖与改善肠道的功能性食品提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

脱脂乳、海藻糖、TAE (50 × Tris-乙酸) 缓冲液 (pH8.4) 和无水乙醇 上海生工生物工程技术有限公司; MRS (De Man Rogosa and Sharp) 培养基 北京陆桥技术有限责任公司; TaKaRa MiniBEST Bacteria Genomic DNA Extraction Kit Ver.3.0 试剂盒 大连宝生物工程有限公司; 3 周龄 SPF (Specific pathogen free) 级雄性 Wistar 大鼠 (动物生产许可证号 SCXK (沪) 2017-0005) 上海斯莱克实验动物有限公司; 基础饲料和高脂饲料 上海普路腾生物科技有限公司。

MilliQ Advantage 型纯水仪 密理博中国有限公司; 5417R 型台式高速低温冷冻离心机 艾本德中国有限公司; ACB-4A1 型超净台 新加坡艺思高科技有限公司; PL2002 型精密天平 梅特勒-托利多国际有限公司; Synergy 2 型多功能酶标仪 美国伯腾仪器有限公司; JY300C 型核酸电泳仪 北京君意东方电泳设备有限公司; 安准型血糖仪 三诺生物传感股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株和培养条件 *E. faecium* B21 菌株由本实验室从中国传统发酵食品中分离、鉴定并保存^[9]。参考 Xu 等^[9]的方法, 经 37 °C 活化后, 以 1% 的接种量接种该菌株于 MRS 液体培养基中, 37 °C 厌氧培养 18 h, 连续传代培养 2 次, 得到新鲜培养物, 以 4000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 用无菌水洗涤 2 次, 重悬菌体于 6% 脱脂乳液中, 使菌体浓度达到 10⁸ CFU/mL。

1.2.2 动物实验 36 只 Wistar 大鼠饲养于上海农林职业技术学院实验动物驯养中心标准化动物实验室, 室温 (20 ± 2) °C, 湿度 40% ~ 60%, 自然光照, 自由摄食和饮水。适应性饲养 2 周后随机分为 3 组: 正常对照组 (NCD 组)、高脂饮食组 (HFD 组)、*E. faecium* B21 干预组 (HFD + B21), 每组 12 只 (每笼 4 只, 每组 3 笼)。NCD 组喂普通饲料, 每天每只大鼠灌胃 0.2 mL 的生理盐水 (0.86% NaCl); HFD 组饲喂高脂饲料, 每天每只大鼠灌胃 0.2 mL 的 6% 脱脂乳液, 脱脂乳液制备方法为: 6 g 脱脂乳 + 6 g 海藻糖溶于 100 mL 去离子水中; HFD + B21 组饲喂高脂饲料, 每天每只大鼠灌胃 0.2 mL 含 10⁸ CFU/mL *E. faecium* B21 的 6% 脱脂乳液。各组大鼠均连续灌胃 7 周。

1.2.3 体重及血糖的测定 实验期间观察大鼠的食欲、毛发、大便和整体精神状态等情况, 每周一次定期称量每只大鼠的体重^[11]。实验第 7 周对所有大鼠进行尾部采血, 使用血糖仪测定空腹血糖^[12]。

1.2.4 高通量测序分析 最后一次灌胃 24 h 后, 分别收集每组 6 只 (每组 3 笼, 每笼 2 只) 大鼠的粪便置于同一个无菌的均质袋内, 加入 50 mL 的 0.86% 的生理盐水充分均质后, 于 4 °C 600 r/min 离心 5 min 去除粪便中的固体物质, 取其上清液采用 TaKaRa MiniBEST Bacteria Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0 试剂盒提取粪便总菌 DNA。提取的 DNA 样品置于干冰中, 送至上海美吉生物医药科技有限公司进行 16S rRNA 基因 V3-V4 区的 PCR 扩增 (上游引物: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3', 下游引物: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'), 并利用 Illumina MiSeq 平台上机测序。采用 UCHIME 软件^[13]对获得的序列进行质量控制, 运用 Mothur Ver.1.32.0 软件^[14]进行物种丰富度指数 (Chao1/ACE 指数)、物种覆盖率、多样性指数 (Simpson/Shannon 指数) 等的分析^[5]。

3.0 试剂盒提取粪便总菌 DNA。提取的 DNA 样品置于干冰中, 送至上海美吉生物医药科技有限公司进行 16S rRNA 基因 V3-V4 区的 PCR 扩增 (上游引物: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3', 下游引物: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'), 并利用 Illumina MiSeq 平台上机测序。采用 UCHIME 软件^[13]对获得的序列进行质量控制, 运用 Mothur Ver.1.32.0 软件^[14]进行物种丰富度指数 (Chao1/ACE 指数)、物种覆盖率、多样性指数 (Simpson/Shannon 指数) 等的分析^[5]。

1.3 数据分析

实验数据处理采用软件 SPSS 17.0 (IBM SPSS 公司) 进行统计学分析, 组间比较采用配对 t 检验。数据结果用均值 ± 标准误 (Mean ± SEM) 表示, $p < 0.05$ 为显著性差异。采用 Fisher' exact test 方法和 0.05 的显著性水平检验组间细菌差异; 基于 Bray-curtis

算法构建聚类树^[15];采用 Origin 8.0 软件绘制物种门/属水平的柱形图。

2 结果与分析

2.1 *E. faecium* B21 对大鼠体重的影响

实验期间观察发现,各组 Wistar 大鼠毛色光滑,精神活跃。由图 1 可知,实验开始前(0 周)时,各组大鼠的体重无显著性差异($p > 0.05$);在实验的第 1~7 周,HFD + B21 组大鼠的体重均显著高于 NCD 组大鼠的体重($p < 0.05$),且在第 4~7 周,也显著高于 HFD 组大鼠的体重($p < 0.05$)。值得注意的是,HFD 组大鼠的体重在第 3~7 周才显著高于 NCD 组($p < 0.05$)。结果表明,高脂饮食能够使 Wistar 大鼠的体重增加,而 *E. faecium* B21 的摄入进一步促进了高脂饮食 Wistar 大鼠体重的增长。与本研究结果一致,丁爽等^[6]也研究发现,*E. faecium* B13 菌株的摄入能显著提高仔猪的体重。但有研究表明,*E. faecium* DM891129 对高脂喂食 Wistar 大鼠体重^[16]和 *E. faecium* SF68 菌株对育肥猪的体重均无显著影响^[17],这可能与实验时间、动物种类或菌株的饲喂量有关。

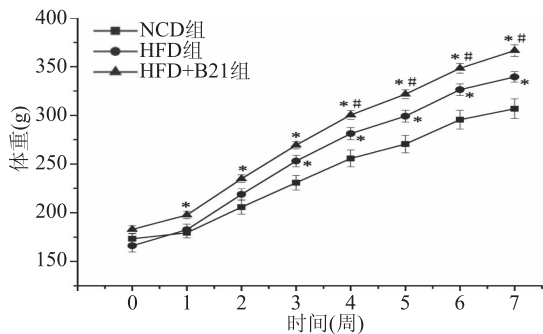


图1 屎肠球菌 B21 的摄入对 Wistar 大鼠体重的影响($n = 12$)

Fig.1 Effect of *E. faecium* B21

on body weights of the Wistar rats($n = 12$)

注:其中*代表与 NCD 组相比差异显著($p < 0.05$);#代表与 HFD 组相比差异显著($p < 0.05$)。图 2 同。

屎肠球菌在动物养殖业,尤其是养猪业中的应用研究较为普遍,可以起到提高动物的生长速度,改善动物健康水平的作用^[8]。本研究结果显示,连续 7 周摄入 *E. faecium* B21 菌株(10^8 CFU/mL)后,显著增加了高脂饮食 Wistar 大鼠的体重($p < 0.05$)。目前,屎肠球菌促进宿主生长的机制假设主要包括:其一屎肠球菌能在肠道中迅速形成优势菌群,增加有益菌数量,抑制有害微生物的繁殖,促进宿主健康生长^[18]。其二屎肠球菌能有效提高营养物质的利用率,促进宿主对营养物质的消化吸收^[8]。其三屎肠球菌在宿主肠道内定殖后,能增强宿主机体抗氧化能力,可以有效地帮助宿主清除机体自由基,保证宿主健康成长^[8];体外益生菌功能评价结果显示,*E. faecium* B21 具有体外抗氧化活性^[9],因此 *E. faecium* B21 促进高脂饮食 Wistar 大鼠体重也可能与其抗氧化活性有关。

2.2 *E. faecium* B21 对大鼠空腹血糖的影响

由图 2 可知,在实验的第 7 周,HFD 组大鼠的空

腹血糖显著高于 NCD 组($p < 0.05$),表明高脂饮食显著提高了 Wistar 大鼠的空腹血糖;而 HFD + B21 组大鼠的空腹血糖显著低于 HFD 组($p < 0.05$),并且与 NCD 组无显著性差异($p > 0.05$),表明摄入 *E. faecium* B21 能够有效抑制由高脂饮食引起的 Wistar 大鼠空腹血糖升高。饲喂 *Lactobacillus acidophilus* ATTC5220 菌株(10^9 CFU/mL)显著降低了高血糖小鼠的空腹血糖水平^[19],同样 *Lactobacillus gasseri* BNR17 菌株(10^7 CFU/mL)也能降低糖尿病小鼠的空腹血糖^[20],上述研究结论与本研究结果相符合。目前,普遍认为乳酸菌降低血糖的机制主要是:其一乳酸菌在分子水平上通过激活胰岛素信号通道,抑制葡萄糖升高^[21];其二乳酸菌的抗氧化能力,研究表明机体氧化损伤和抗氧化能力在糖尿病的发病机制中起着非常重要的作用^[22]。因此 *E. faecium* B21 降低高脂饮食大鼠空腹血糖可能与其抗氧化活性有关。

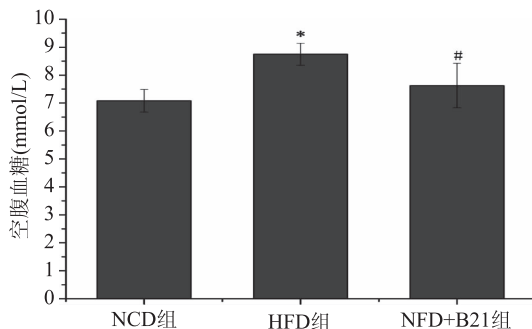


图2 屎肠球菌 B21 摄入 7 周

对 Wistar 大鼠空腹血糖的影响($n = 12$)

Fig.2 Effect of *E. faecium* B21 on fasting blood glucose levels of the Wistar rats treated for seven weeks($n = 12$)

2.3 菌群丰度和多样性分析

为比较三组大鼠粪便样本的菌群差异,利用 Illumina MiSeq 测序平台分析了样本菌群组成,共获得 114071 条高质量序列,平均序列长度为 432 bp。三组样本的物种覆盖度值均大于 0.99,表明本研究的测序深度覆盖了样本中菌群的绝大多数(表 1)。由图 3A 可知,三组样品的稀释曲线趋向平坦,说明测序数据量合理;由 Shannon-Wiener 曲线(图 3B)可知,NCD 组样品的群落多样性最高,HFD 组次之,HFD + B21 组最低,说明高脂饮食和 *E. faecium* B21 均降低了 Wistar 大鼠粪便中菌群多样性;NCD 组的 Rank-Abundance 曲线(图 3C)在水平方向上最宽,且曲线最平缓,说明 NCD 组样品物种丰度最高,且物种分布最均匀,HFD 组次之,HFD + B21 组物种丰度最低,且分布最不均匀,说明高脂饮食和 *E. faecium* B21 的摄入降低了 Wistar 大鼠粪便中菌群丰度。另外,序列分析鉴定到的 OTU (Operational Taxonomic Units) 数量也是 NCD 组最多(648),HFD 组次之(395),HFD + B21 组最少(350),这与 Rank-Abundance 曲线得出的结果相符,且喂食高脂饲料的 HFD 组和 HFD + B21 组之间菌群丰度差异较小。且 ACE 值和 Chao1 值在 NCD 组最高(ACE 值为 700.57,Chao1 值为 698.07),HFD + B21 组最低(ACE 值为 398.12,Chao1 值为 398.49),说明 NCD 组菌群

表1 三组样品的 OTU 数量及菌群多样性
Table 1 OTU numbers and diversity of bacterial population in three groups

组别	序列数	OTU 数量	香农指数	辛普森指数	ACE 指数	Chao1 指数	物种覆盖度
NCD 组	39590	648	5.06	0.016	700.57	698.07	0.996805
HFD 组	38110	395	4.11	0.049	473.47	486.97	0.996919
HFD + B21 组	36371	350	3.83	0.043	398.12	398.49	0.997961

丰度最高, HFD + B21 组最低。此外, HFD + B21 组的 Shannon 值最小(3.83), 而 NCD 组的 Shannon 值最大(5.06), 也表明 NCD 组的菌群多样性最高(表 1)。综上所述, Wistar 大鼠粪便菌群丰度和多样性由高到低依次为 NCD 组 > HFD 组 > HFD + B21 组, 表明高脂饮食降低了大鼠粪便菌群的丰度和多样性, 这与马宁等^[23]的研究结果一致。

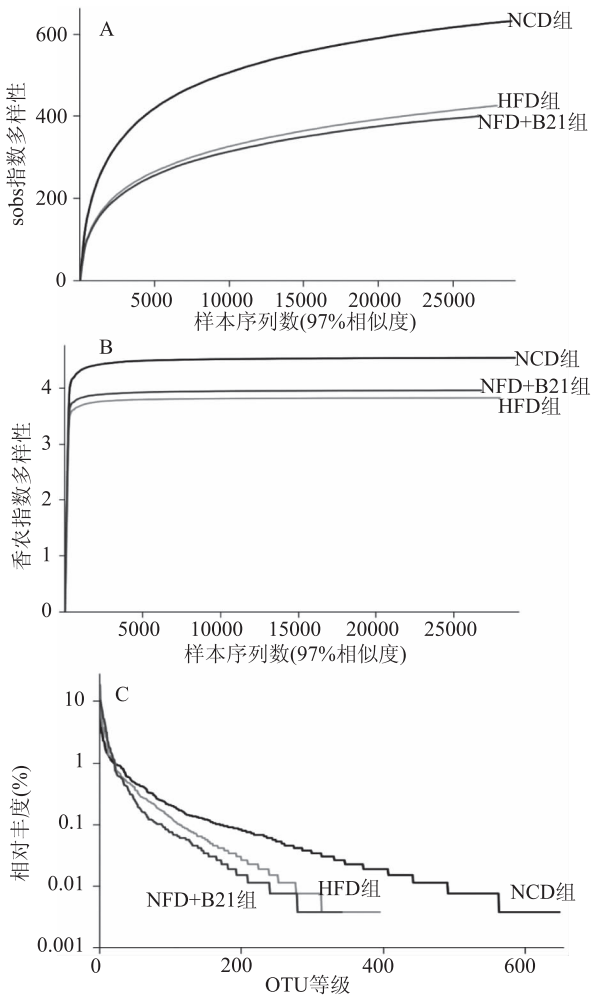


图3 三组样本的稀疏曲线(A)、香农-威纳曲线(B)和等级丰度曲线(C)

Fig.3 Rare faction curve(A), Shannon-Wiener curve(B) and rank-abundance curve(C) of the 3 experimental groups

2.4 门水平上的菌群组成及差异分析

由图 4 可知, 三组大鼠样本肠道粪便菌群隶属于 10 个门: 厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、变形菌门 (Proteobacteria)、软壁菌门 (Tenericutes)、酸杆菌门 (Actinobacteria)、螺旋菌门 (Spirochaetae)、蓝菌门 (Cyanobacteria)、Saccharibacteria、迷踪菌门 (Elusimicrobia) 和疣微菌

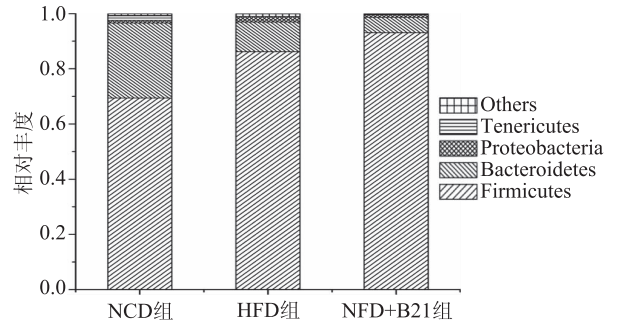


图4 三组样本菌群在门水平上的相对丰度

Fig.4 Relative abundance of the 3 experimental groups at the phylum level

注: 丰度小于 1% 的门归为其他。图 6 同。

门 (Verrucomicrobia)。其中 Saccharibacteria 和 Elusimicrobia 仅存在于 NCD 组。在各样本的菌群组成中, Firmicutes 丰度最高, 其次是 Bacteroidetes。Firmicutes 在 NCD 组中占比最低(69.42%), 在 HFD 组和 HFD + B21 组占比分别为 88.20% 和 93.10%。相反, Bacteroidetes 在 NCD 组中丰度最高(27.20%), 而在高脂饲料喂食的 HFD 和 HFD + B21 组中丰度下降, 分别为 10.73% 和 5.59%。通过费舍尔检验 (Fisher' exact test) 样本间物种差异, 结果显示, NCD 组与 HFD 组共有的 9 个菌门 (Firmicutes、Bacteroidetes、Protepbacteria、Tenericutes、Actinobacteria、Verrucomicrobia、Spirochaetae、Cyanobacteria、Saccharibacteria) 均为差异性菌门(图 5), 表明高脂饲料明显改变了门水平上的菌群组成; 而 HFD 组与 HFD + B21 组间有 6 个菌门 (Firmicutes、Bacteroidetes、Protepbacteria、Actinobacteria、Verrucomicrobia 和 Spirochaetae) 为差异性菌门。值得注意的是, NCD 组、HFD 组和 HFD + B21 组样本中的 Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) 的比值分别为 2.55、8.03 和 16.66, 表明高脂饲料明显提高了 HFD 组和 HFD + B21 组的 F/B 比值, 且 HFD + B21 组(6.53 倍)增加幅度明显高于 HFD 组(3.15 倍)。据文献报道, 人类和鼠科动物肠道菌群中 F/B 的比值变化与肥胖相关^[24], 高脂饮食和肥胖能增大 F/B 的比值^[25]。本研究结果表明, 高脂饲料导致 Wistar 大鼠肠道菌群中 Firmicutes 增加, Bacteroidetes 降低, 即 F/B 比值增大, 这与已有研究报道一致^[26]。HFD + B21 组的 F/B 比值大于 HFD 组, 说明 *E. faecium* B21 的长期摄入促进了高脂饮食大鼠的肥胖, 这与本实验中 HFD + B21 组大鼠的体重高于 HFD 组的结果相符。Firmicutes 在肠道中能够促进多糖发酵, 该菌门的增多可能导致机体肥胖^[26], 所以 Firmicutes 可能介导了 HFD + B21 组大鼠体重的增加。此外, 隶属于

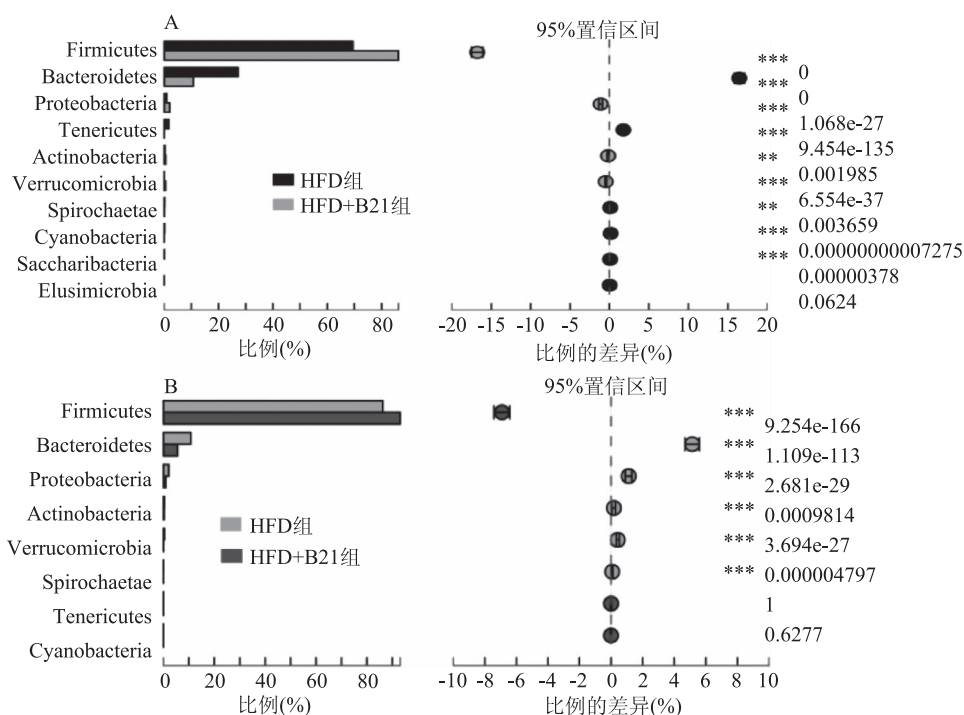


图5 NCD组与HFD组(A)、HFD组与HFD+B21组(B)的菌群在门水平上的费舍尔检验
Fig.5 Fisher' exact test bar plot of NCD vs HFD(A) and HFD vs HFD + B21 (B) at the phylum level
注:右侧图表示所设定的置信度区间内物种丰度的差异。*表示差异显著 $p < 0.05$,

** 差异极显著 $p < 0.01$, *** 差异极其显著 $p < 0.001$ 。

Proteobacteria 的大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、沙门氏菌 (*Salmonella*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter rodentium*) 等菌是人类致病菌^[26]。尽管 *E.faecium* B21 的摄入降低了高脂饲料喂食大鼠肠道菌群的多样性,但是 Bacteroidetes 和 Proteobacteria 的占比随之下降,说明 *E.faecium* B21 的摄入能够改善由高脂饮食引起的肠道菌群失调,这与黄怡^[5]关于 *E.faecium* EF1 以及 Wang 等^[27]关于 *L.plantarum* P8 的摄入对仔猪和人体肠道菌群的研究报道一致。

2.5 属水平上的菌群组成及差异分析

三组样本在属水平上的菌群组成如下:NCD 组主要包括未分类属_拟杆菌_S24-7_组 (*Bacteroidales_S24-7_group_norank*)、瘤胃球菌科_UCG-005_组 (*Ruminococcaceae_UCG-005*)、毛螺旋菌科未分类属 (*Lachnospiraceae_unclassified*)、乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*) 和罗斯伯里氏菌属 (*Roseburia*),这5个属占菌群总量的 50.46% (图 6)。而 HFD 组和 HFD + B21 组的优势菌属为 *Ruminococcaceae_UCG-005*、*Lachnospiraceae_unclassified* 和布劳特氏菌属 (*Blautia*) 等。如表 2 所示,益生菌菌属 *Blautia*、乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*) 和双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)^[26-27] 的变化如下:*Blautia* 在 NCD、HFD 和 HFD + B21 组菌群总量中的丰度分别为 0.98%、8.52% 和 17.38%,*Lactobacillus* 在 NCD、HFD 和 HFD + B21 组菌群总量中的丰度分别为 5.84%、4.45% 和 1.87%,而 *Bifidobacterium* 在三组样本中菌群总量中分别占比 0.08%、0.23% 和 0.19%。这表明饲喂高脂饲料减少了大鼠肠道中的 *Lactobacillus*,但

促进了 *Blautia* 和 *Bifidobacterium* 的增殖,这与曹宏芳等^[25]的研究结果不同,可能与 *Blautia* 和 *Bifidobacterium* 在肠道中代谢的物质有关,因为不同的高脂饲料含有的脂肪类型可能不同,高脂饲料和普通饲料中膳食纤维类型也可能不同^[28];而 *E.faecium* B21 的摄入进一步促进了大鼠肠道中 *Blautia* 的生长,这与曲巍等^[29]对于复合益生菌提高了小鼠肠道中 *Blautia* 的研究结果相一致;但 *E.faecium* B21 的摄入抑制了 *Lactobacillus* 和 *Bifidobacterium* 的增殖,这与 *L.plantarum* P8 增加了健康人群粪便菌群中的 *Bifidobacterium*^[27],以及 *Lactobacillus paracasei* LC01 活菌可以显著提高小鼠肠道内 *Lactobacillus*^[30] 的研究报道不同,这可能与菌种及其来源、实验动物、饲料含脂量、实验周期等因素有关。而对于机会致病菌假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*)^[23] 的变化为:与 NCD 组 (0.015%) 相比,高脂饲料明显促进了 *Pseudomonas* 的生长:HFD 组 (0.15%), HFD + B21 组 (0.12%) (表 2);*Desulfovibrio* 在 HFD 组中丰度最高 (1.41%),NCD 组次之 (0.38%),HFD + B21 组最低 (0.11%),表明高脂饲料同样刺激了 *Desulfovibrio* 在大鼠肠道中的增殖,而 *E.faecium* B21 的摄入则抑制了机会致病菌属 *Pseudomonas* 和 *Desulfovibrio* 的生长。此外, *Enterococcus* 在三组样本中的丰度分别为 0.022%、0.019% 和 1.31%,说明高脂饲料抑制了 *Enterococcus* 的生长,这与刘雪姬等^[31]关于高脂饮食小鼠肠道中 *Enterococcus* 减少的结果一致;然而,*E.faecium* B21 的摄入极大提高了高脂饲料喂食大鼠肠道中 *Enterococcus* 的丰度 (68.95 倍),说明 *E.faecium* B21

的摄入很有可能在肠道中成功定殖。

肠道菌群与宿主相互依存、相互制约^[32], 肠道菌群平衡失调会引起机体急慢性疾病的发生^[26,30]。本研究结果表明 *E.faecium* B21 的摄入很有可能在肠道中成功定殖, 进而发挥益生作用。从尿肠球菌促进机体生长的机制可以看出, 益生菌调节肠道菌群的作用和宿主的体重息息相关; 其中, 尿肠球菌促进机体生长的部分机制也是益生菌调节肠道菌群的作用机制^[33]。

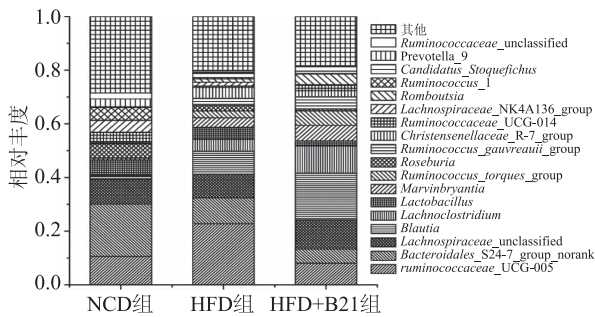


图6 三组样本菌群在属水平上的相对丰度

Fig.6 Relative abundance of the 3 experimental groups at the genus level

表2 三组样本中鉴定到的益生菌属和机会致病菌属

Table 2 Probiotics and potential pathogenic bacteria identified in the three experimental groups at the genus level

菌属名	菌群丰度(%)		
	NCD 组	HFD 组	HFD + B21 组
益生菌属			
<i>Blautia</i>	0.98	8.52	17.38
<i>Lactobacillus</i>	5.84	4.45	1.87
<i>Bifidobacteria</i>	0.08	0.23	0.19
潜在致病菌属			
<i>Pseudomonas</i>	0.015	0.15	0.12
<i>Desulfovibrio</i>	0.38	1.41	0.11

2.6 OTU 水平上的菌群组成及差异分析

此外, 在 OTU 水平上, 序列分析揭示了三组样本菌群中 648 (NCD 组)、395 (HFD 组)、350 (HFD + B21 组) 个 OTU。其中 238 个 OTU 为三组样本所共有。而 NCD、HFD 和 HFD + B21 组特有的 OTU 占比分别为 47.69%、9.11%、9.71% (图 7)。组间聚类分析结果显示, HFD 组和 HFD + B21 组聚为一簇, 且与 NCD 分离, 表明与 NCD 相比, HFD 组和 HFD + B21 组菌群较为相似 (图 8)。

3 结论

本研究结果表明, 高脂饲料的摄入明显提高了 Wistar 大鼠的体重和空腹血糖, 改变了 Wistar 大鼠肠道粪便菌群的结构, 导致肠道微生态失衡; 而连续 7 周的 *E.faecium* B21 菌株的摄入增加了高脂饮食 Wistar 大鼠的体重, 同时降低了高脂饮食大鼠的空腹血糖, 并且提高了大鼠肠道中益生菌属 *Blautia* 的丰度, 抑制了致病菌属 *Pseudomonas*、*Desulfovibrio* 的生长。表明 *E.faecium* B21 在动物养殖业有一定的应用价值, 在降低高脂饮食 Wistar 大鼠血糖和改善其肠道菌群失调方面具有一定的益生作用。

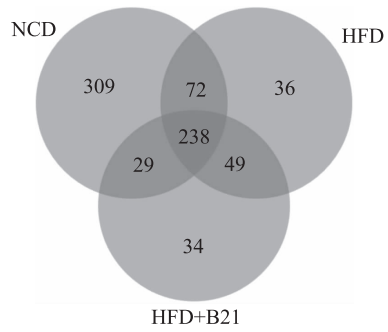


图7 三组样本在 OTU 水平上的韦恩图

Fig.7 Venn diagram of the three experimental groups at the OTU level

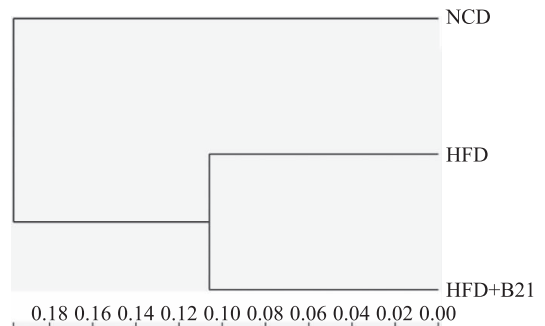


图8 三组样本在 OTU 水平上的聚类树

Fig.8 Hierarchical clustering tree of the three experimental groups at the OTU level

参考文献

- [1] Zhai Q X, Xiao Y, Zhao J X, et al. Identification of key proteins and pathways in cadmium tolerance of *Lactobacillus plantarum* strains by proteomic analysis [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 1182-1199.
- [2] 孟晓, 蒋丽施, 骞宇, 等. 用于降血糖的乳酸菌研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2016, 37(6): 193-196.
- [3] Kwok L Y, Guo Z, Zhang J, et al. The impact of oral consumption of *Lactobacillus plantarum* P-8 on faecal bacteria revealed by pyrosequencing [J]. Beneficial Microbes, 2015, 6(4): 405-413.
- [4] Zhang F, Liang Q, Xu X, et al. Beneficial effects of probiotic cholesterol-lowering strain of *Enterococcus faecium* WEFA23 from infants on diet-induced metabolic syndrome in rats [J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(3): 1618-1628.
- [5] 黄怡. 尿肠球菌 EF1 对仔猪小肠黏膜屏障功能的影响 [D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- [6] 丁爽, 郭春华, 张正帆, 等. 产乳酸菌素尿肠球菌 B13 对断奶仔猪生长性能、养分消化率、血清免疫指标及粪便微生物菌群的影响 [J]. 畜牧兽医学报, 2017, 48(10): 1902-1911.
- [7] Zeyner A and Boldt E. Effects of a probiotic *Enterococcus faecium* strain supplemented from birth to weaning on diarrhoea patterns and performance of piglets [J]. Journal of Animal Physiology & Animal Nutrition, 2006, 90(1-2): 25-31.
- [8] 王永. 尿肠球菌对断奶仔猪促生长机理及应用效果的研究 [D]. 济南: 山东农业大学, 2013.
- [9] Xu S, Liu T G, Radji CAI, et al. Identification and evaluation

of new lactic acid bacteria strains with both cellular antioxidant and bile salt hydrolase activities *in vitro* [J]. Journal of Food Protection, 2016, 79(11): 1919-1928.

[10] 杨静, 马如慧, 杨智茜, 等. 2株乳酸菌的生长和潜在益生菌特性[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2017, 43(2): 239-246.

[11] 谢宁. 两株乳酸杆菌对高脂饮食大鼠胆固醇影响及相关机制研究[D]. 长沙: 中南大学, 2011.

[12] 王正根. 两株乳杆菌体内降胆固醇的筛选及相关机制的研究[D]. 长沙: 中南大学, 2010.

[13] Tang Y Y, Tao P Y, Tan J G, et al. Identification of bacterial community composition in freshwater aquaculture system farming of *Litopenaeus vannamei* reveals distinct temperature - driven patterns [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(8): 13663-13680.

[14] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, et al. Introducing mothur: Open - source, platform - independent, community - supported software for describing and comparing microbial communities [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2009, 75(23): 7537-7542.

[15] Zhang Y, Du R, Wang L, et al. The antioxidative effects of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang on the hyperlipidemic rats [J]. European Food Research and Technology, 2010, 231(1): 151-158.

[16] 袁杰利, 矫东风, 康白, 等. 屎肠球菌 DM891129 菌株对大鼠高血脂症的调节作用[J]. 中国微生态学杂志, 1999, 11(6): 377-378.

[17] Chen Y J, Min B J, Cho J H, et al. Effects of dietary *Enterococcus faecium* SF68 on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics and faecal noxious gas content in finishing pigs [J]. Asian Australasian Journal of Animal Sciences, 2006, 19(3): 406-411.

[18] 王前光, 高惠林, 刘秋. 微生态制剂的研究进展及其在养猪生产上的应用[J]. 饲料广角, 2010(24): 45-47.

[19] 王雪, 文姝, 李华军, 等. 嗜酸乳杆菌对 II 型糖尿病小鼠预防与治疗的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(12): 1069-1073.

[20] Yun S I, Park H O, Kang J H. Effect of *Lactobacillus gasseri*

BNR17 on blood glucose levels and body weight in a mouse model of type 2 diabetes [J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 107(5): 1681-1686.

[21] 陈佩. 益生乳酸菌的降糖作用及其机制的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014.

[22] Maritim A C, Sanders R A, Watkins J B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review [J]. Journal of Biochemical & Molecular Toxicology, 2003, 17(1): 24-38.

[23] 马宁, 刘希望, 孔晓军, 等. 长期饲喂高脂饲料对大鼠血脂、肝及肠道菌群的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2017, 48(7): 1271-1280.

[24] Shen J, Obim M S, Zhao L P. The gut microbiota, obesity and insulin resistance [J]. Molecular Aspects of Medicine, 2013, 34(1): 39-58.

[25] 曹宏芳, 张家超, 王芳, 等. 高脂饮食对雄性 SD 大鼠肠道菌群的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2012, 24(2): 102-108.

[26] Song C, Wang B C, Tan J, et al. Comparative analysis of the gut microbiota of black bears in China using high-throughput sequencing [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2017, 292(2): 407-414.

[27] Wang L F, Zhang J C, Guo Z, et al. Effect of oral consumption of probiotic *Lactobacillus planatarum* P-8 on fecal microbiota, SIgA, SCFAs, and TBAs of adults of different ages [J]. Nutrition, 2014, 30(7-8): 776-783.

[28] 张晶, 覃小丽, 刘雄, 等. 膳食主成分对肠道微生物的研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(5): 305-309.

[29] 曲巍, 张智, 马建章, 等. 高通量测序研究益生菌对小鼠肠道菌群的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(1): 214-219.

[30] 陆文伟, 杨震南, 丁历伟, 等. 益生菌 *Lactobacillus paracasei* LC01 对小鼠肠道菌群的调节作用[J]. 食品科学, 2016, 37(23): 230-235.

[31] 刘雪姬, 陈庆森, 闫亚丽. 高脂饮食对小鼠肠道菌群的影响[J]. 食品科学, 2011, 32(23): 306-311.

[32] 郑艺, 张家超, 郭壮, 等. 基于高通量测序技术分析肠道菌群及其影响因素的研究进展[J]. 中国食品学报, 2014, 14(11): 157-164.

[33] 孙笑非, 温俊. 益生菌调节肠道菌群的作用机制及研究进展[J]. 饲料研究, 2010(4): 56-58.

(上接第 205 页)

243-255.

[18] 王乃强, 张艳君, 薛雅莺, 等. 海藻糖的性质及应用[J]. 精细与专用化学品, 2014, 22(1): 35-37.

[19] 康彦. 抗冻剂对罗非鱼冻藏品质影响的研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2014: 9-26.

[20] 王振宇, 杨春瑜, 金钟跃. 超声波提取芦荟凝胶的工艺[J]. 东北林业大学学报, 2002, 30(4): 71-72.

[21] 朱少娟, 施用晖, 乐国伟. 超声波对胰蛋白酶水解酪蛋白的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(2): 50-54.

[22] 陈琼希. 不同处理方式对鲢鱼鱼肉蛋白的影响研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2012: 13-20.

[23] 常海霞. 超声波技术对草鱼肌原纤维蛋白营养和结构性质的影响[D]. 南昌: 南昌大学, 2015: 35-46.

[24] 谢明杰, 宋明, 邹翠霞, 等. 超声波提取大豆异黄酮[J]. 大豆科学, 2004, 23(1): 75-76.

[25] Sin H N, Yusof S, Hamid N S A, et al. Optimization of hot water extraction for sapodilla juice using response surface methodology [J]. Journal of Food Engineering, 2006, 75(3): 352-358.

[26] 曾小峰, 白小鸣, 盖智星, 等. 响应面试验优化超声辅助提取柚皮纤维素工艺[J]. 食品科学, 2015, 36(14): 34-38.