



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20220136

戊糖片球菌改善高脂饮食小鼠肠道菌群机制研究

吴琼, 赵昕, 杜立欣, 王晓蕊, 毛淑红
(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 为了探究具有降胆固醇能力的肠道微生物对高脂饮食引起的高胆固醇血症的作用, 本研究从人体粪便中分离出具有高效降胆固醇能力且耐胃蛋白酶、胰蛋白酶、胆盐的肠道微生物。选取优势肠道微生物进行菌种鉴定后进行小鼠实验, 测定小鼠的体质量、脏器系数、肝脏及粪便的胆固醇含量, 研究其降胆固醇作用。实验筛选获得具有较强降胆固醇能力的肠道微生物 P4, 经鉴定为戊糖片球菌 (*Pediococcus pentosaceus*), 其能够抑制高脂饮食诱导的小鼠血清中胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 的升高, 降低肝脏和粪便中的胆固醇及血清中的高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C), 从而达到降血脂的目的。通过高通量测序实验分析了小鼠肠道的菌群组成, 发现戊糖片球菌 P4 能够通过改善肠道微生物的组成和丰度降低小鼠肠道中厚壁菌门 (Firmicutes) 与拟杆菌门 (Bacteroidetes) 的比值, 改善由小鼠高脂饮食引起的高胆固醇血症。因此, 筛选出的戊糖片球菌 P4 对降胆固醇功能产品的研究开发具有重要意义。

关键词: 益生菌; 戊糖片球菌; 肠道菌群; 胆固醇; 高胆固醇血症

中图分类号: TS201.4 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2023)02-0028-07

Mechanism of *Pediococcus pentosaceus* Improving Intestinal Flora in Mice with High-Fat Diet

WU Qiong, ZHAO Xin, DU Lixin, WANG Xiaorui, MAO Shuhong

(College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: In order to explore the effect of gut microbes with cholesterol-lowering ability on high-fat diet-induced hypercholesterolemia, in this study we isolated gut microbes with high cholesterol-lowering ability and resistance to pepsin, trypsin, and bile salts. After selecting the dominant intestinal microorganisms for bacterial species identification, we conducted mouse experiments to determine the body weight, organ coefficient, cholesterol content of liver and feces of mice, and further studied their cholesterol-lowering effect. The intestinal microbe P4 with strong cholesterol-lowering ability was screened experimentally, and identified as *Pediococcus pentosaceus*, which could inhibit the increase of serum cholesterol (TC), triglyceride (TG) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in mice induced by high fat diet, and also reduce cholesterol in liver and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in serum, thus achieving the purpose of lowering blood lipids. The microbiota composition of the mouse gut was analyzed by high-throughput sequencing experiments, and it was found that *Pediococcus pentosaceus* P4 could improve hypercholesterolemia induced by high-fat diet in mice, by reducing the ratio of Firmicutes and Bacteroidetes in the mouse gut by means of improving the composition and abundance of gut microbes. Therefore, the screened *Pediococcus pentosaceus* is of great significance for the research and development of cholesterol-lowering functional products.

Key words: probiotics; *Pediococcus pentosaceus*; intestinal bacteria; cholesterol; hypercholesterolemia

近年来,随着人们生活水平的提高,人们日常摄入高脂食物较多,造成患心血管疾病人数逐年增多,心血管疾病成为威胁人们健康最严重的疾病之一,而高胆固醇血症这种极其严重的脂质代谢疾病可导致

收稿日期: 2022-05-30; 修回日期: 2022-10-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21878233)

作者简介: 吴琼 (1997—), 女, 湖北黄冈人, 硕士研究生; 通信作者: 毛淑红, 教授, shuhongmao@tust.edu.cn

心肌梗死等心脏病的发生,是诱发心血管疾病的原因之一^[1]。人体内胆固醇含量的升高可能引起高胆固醇血症的发生,因此降低胆固醇水平可以降低心血管疾病的发病率。目前,降低胆固醇最常用的措施是药物治疗,然而长期服用药物不仅价格昂贵,而且具有一定的毒副作用^[2]。筛选具有降胆固醇作用的微生物具有重要意义。

目前降胆固醇微生物的研究主要集中在益生菌方面,益生菌定植于肠道中,有助于肠道菌群的存活和肠道微生态系统的平衡,能够抑制致病菌的代谢、繁殖和入侵,减轻有害细菌对机体所造成的损害,在食品及医药领域应用广泛^[3]。研究表明,益生菌也具有体外胆固醇去除能力,这些菌株主要包括双歧杆菌属^[4]、乳杆菌属^[5]等。对于具有降胆固醇能力的益生菌而言,即使来源于同一属的菌株,不同菌株去除胆固醇的能力仍差异较大^[6]。陈珂可等^[7]研究发现,从健康人群粪便中筛选出5株双歧杆菌,其中乳双歧杆菌(*Bifidobacterium lactis*)FB001的体外胆固醇去除率为50%以上,而FB014的胆固醇去除率只有2.4%。因此,进一步筛选具有降胆固醇能力的菌株仍然极为重要。

本实验从人体粪便中筛选出降胆固醇作用明显、生长特性优异的肠道菌株,通过体外降胆固醇机制分析,对C57BL/6J小鼠肠道内菌群结构影响进行研究,同时对该菌株在体内的降胆固醇功效进行检测,为戊糖片球菌作为功能性食品和药物的开发利用提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与动物

菌株来源:取自20名1周内未服用抗生素人的粪便。

实验动物:C57BL/6J小鼠,3周龄,雄性,(20±2)g,购自北京斯贝福生物技术有限公司(批准号:IACUC-JKX-2008-1)。本实验经过实验动物伦理委员会审核,符合动物保护、动物福利和伦理原则,符合国家实验动物福利伦理的相关规定。

1.1.2 主要仪器

UT 205型厌氧罐,尤德生物科技有限公司(广州);Himac CR 21G型台式高速冷冻离心机,日本Hitachi Centrifuge公司;Infinite® 200 Pro Tecan型多功能酶标仪,上海迪奥生物科技有限公司;PHS-2C

型pH计,梅特勒-托利多仪器(上海)公司;DHG-9240A型电热恒温鼓风干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司;Vortex-2型涡旋振荡器,上海沪析实业有限公司。

1.1.3 主要培养基

MRS培养基:MRS干粉培养基4.925g溶于100mL蒸馏水,121℃灭菌20min。

BHI培养基:BHI干粉培养基3.85g溶于100mL蒸馏水,121℃灭菌20min。

MRS-THIO培养基:将胆固醇0.1g、蔗糖酯0.1g、吐温80 1.0mL、冰乙酸5.0mL混匀,加入终质量浓度为0.1mg/mL的胆固醇溶液、0.2%的巯基乙酸钠和牛胆盐,pH调至6.5±0.2,121℃灭菌20min。

1.2 实验方法

1.2.1 降胆固醇微生物的筛选

取新鲜人体粪便样品,培养于MRS、BHI固体培养基,37℃厌氧培养48h,以3%的接种量接种至灭菌的MRS-THIO培养基,37℃厌氧培养48h,根据GB 5009.128—2016《食品安全国家标准 食品中胆固醇的测定》的硫酸铁铵比色法,通过测定560nm处的吸光度测定胆固醇的含量。以未接菌的MRS-THIO培养基为对照,按照式(1)计算胆固醇的去除率(R),重复3次取平均值。筛选出表现优异的肠道微生物,通过硫酸铁铵比色法比较菌株在不同降解时间内的胆固醇去除率及不同初始pH下的去除率,并分析菌株对3mg/mL pH 3.0胃蛋白酶、1mg/mL pH 7.0胰蛋白酶及0.03%~1%胆盐的耐受力,筛选出一株具有生长优势的菌株。将筛选出的菌株在MRS培养基上培养,在电子显微镜下观察菌体形态,并进行分子生物学测序分析。

$$R = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中: A_0 和 A_1 分别为未接菌和已接菌的MRS-THIO培养基的吸光度。

1.2.2 肠道微生物体外降胆固醇的方式分析

将筛选出的菌株以3%接种量接种于MRS-THIO培养基,37℃厌氧培养48h,取5mL菌悬液5000g离心10min。取1mL上清液样品(A),将沉淀用5mL pH 6.8的0.1mol/L PBS缓冲液重悬。取1mL重悬液8000g离心10min,取重悬后的上清液样品(C)。另取1mL菌悬液,加入1% 50mg/mL溶菌酶、1%质量分数为10%的十二烷基硫酸钠(SDS),冰浴20min,超声破碎至菌液澄清。13000g离心10min,取破碎后上清液样品(B)。将离心后的破碎

液沉淀用 1.0 mL pH 6.8 的 0.1 mol/L PBS 缓冲液重悬, 获得破碎后沉淀重悬上清液样品 (D)。

将获得的菌体上清液、菌体 PBS 重悬后的上清液、破碎后上清液、破碎后沉淀重悬上清液样品分别置于 EP 管内, 氮吹使溶液完全挥发, 再用等体积甲醇复溶, 0.22 μm 滤膜过滤, 高效液相色谱法(蒸发光散射检测器)检测胆固醇含量, 根据胆固醇标准曲线 ($y = 0.3922x - 0.0182$), 采用面积归一法计算转化率 (T)^[8]。

$$T = \frac{S_1 - S_2}{S_1} \times 100\% \quad (2)$$

式中: S_1 和 S_2 分别为转化前底物的峰面积和转化后底物的峰面积。

菌株胆固醇去除率 (R_1)、共沉淀作用的胆固醇去除率 (R_2) 和菌体吸收作用的胆固醇去除率 (R_3) 按照式(3)~式(5)计算。

$$R_1 = \frac{\rho_E - \rho_A}{\rho_E} \times 100\% \quad (3)$$

$$R_2 = \frac{\rho_C}{\rho_E} \times 100\% \quad (4)$$

$$R_3 = \frac{\rho_B + \rho_D - \rho_C}{\rho_E} \times 100\% \quad (5)$$

式中: ρ_A 为培养基上清液中的胆固醇含量, $\mu\text{g/mL}$; ρ_B 为菌株破壁后上清液中的胆固醇含量, $\mu\text{g/mL}$; ρ_C 为菌株洗涤液中的胆固醇含量, $\mu\text{g/mL}$; ρ_D 为菌株破壁后沉淀重悬上清液中的胆固醇含量, $\mu\text{g/mL}$; ρ_E 为不接种肠道菌的 MRS-THIO 培养基中的胆固醇含量, $\mu\text{g/mL}$ 。

1.2.3 动物实验

动物饲养温度 (25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 50% ~ 60%。所有小鼠进行 3 d 的适应性培养之后, 按照各组平均体质量无显著差异的原则重新分为 3 组, 每组 8 只。对照组喂养普通饲料(大小鼠维持饲料, 斯贝福生物技术有限公司), HFD 组喂养高脂饲料(高脂饲料 D12492, 斯贝福生物技术有限公司), HFDP4 组喂养高脂饲料及肠道菌。

将实验用菌活化后, 接种至 MRS 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 24 h 后, 5000 r/min 离心 10 min 收集菌体。菌体冻干 24 h, 使用时用无菌生理盐水溶解菌粉制成菌悬液, 活菌数为 10^9 mL^{-1} 。

正常喂养 4 周后, HFDP4 组每日灌胃 0.3 mL 肠道菌菌悬液, 对照组及 HFD 组灌胃等量的生理盐水。观察小鼠在实验期间的健康状态、进食情况。

1.2.4 脏器指标测定

在实验周期内, 每天灌胃之前观察小鼠的皮毛状态、精神活动反应、排便情况及粪便颜色等并记录。每周称 1 次小鼠体质量, 记录小鼠体质量的变化趋势。在第 4 周、第 8 周、第 12 周对小鼠进行眼眶采血, 将血液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、4500 r/min 条件下离心 20 min, 取上清液用相应试剂盒(南京建成生物工程研究所)测定总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)。第 12 周, 取小鼠新鲜粪便置于无菌冻存管中, 用于粪便中胆固醇以及菌群多样性分析。将小鼠称量后进行摘眼球采血并处死, 取肝脏、心脏, 用生理盐水将脏器冲洗干净, 吸干水分后称量, 按照式(6)计算脏器系数 (d)。

$$d = \frac{m_2}{m_1} \times 100\% \quad (6)$$

式中: m_1 和 m_2 分别为小鼠的体质量和脏器质量, g。

1.2.5 小鼠肠道菌群分析

取小鼠粪便样品, 参考 QIAamp DNA Stool Mini Kit 说明书提取粪便样本 DNA, 将其作为模板 PCR 扩增细菌 16S rRNA 基因的 V3-V4 区域, 文库制备及 Illumina MiSeq 平台双末端高通量测序由北京百迈客生物科技有限公司完成。上游引物为 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3', 下游引物为 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'。

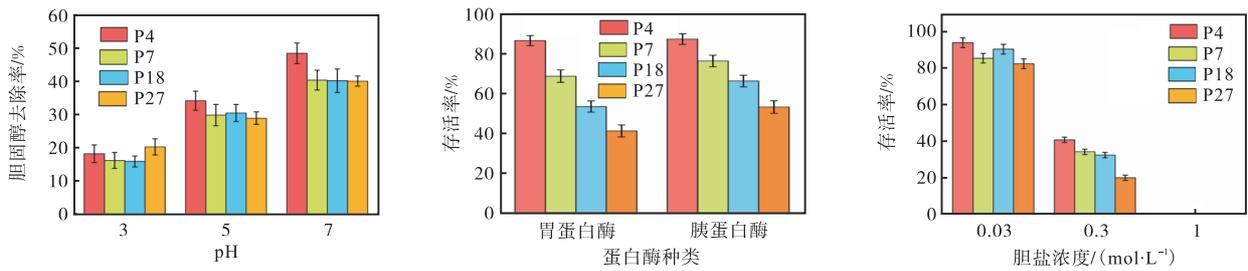
1.3 数据分析

数据用 SPSS 26 统计软件进行配对样本 t 检验, 结果均用“平均数 \pm 标准差”表示, * 表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 降胆固醇肠道微生物的筛选

采集的 20 份人体粪便样品经稀释涂布培养, 最终分离出 4 株具有较高降胆固醇活性的菌株。通过测定筛选得到的肠道微生物在不同发酵时间及不同 pH 培养基的胆固醇降解率, 结合在模拟胃肠环境下的存活率, 得到一株具有良好降胆固醇活性且生长特性良好的菌株 P4。肠道微生物胆固醇的生理特性如图 1 所示, 发酵时间对胆固醇去除率的影响见表 1。将筛选获得的菌株 P4 通过结晶紫染色, 通过电子显微镜观察, 发现菌体细胞抱团聚集。进一步通过 16S rDNA 序列分析, 最终确定该菌为戊糖片球菌 (*P. pentosaceus*), 命名为 *P. pentosaceus* P4。



(a) pH 对胆固醇去除率的影响 (b) 肠道微生物在胃蛋白酶和胰蛋白酶下的存活率 (c) 肠道微生物在不同胆盐浓度下的存活率

图 1 肠道微生物胆固醇的生理特性

Fig. 1 Physiological properties of gut microbial cholesterol

表 1 发酵时间对胆固醇去除率的影响

Tab. 1 Effect of fermentation time on cholesterol removal rate

菌株	胆固醇去除率/%		
	24 h	48 h	72 h
P4	25.00 ± 1.85	48.52 ± 3.12	34.29 ± 3.36
P7	27.50 ± 2.11	40.44 ± 2.39	21.43 ± 2.46
P18	22.50 ± 1.35	40.27 ± 2.65	10.20 ± 0.81
P27	28.75 ± 1.33	40.15 ± 2.22	21.00 ± 0.56

2.2 戊糖片球菌 P4 体外降胆固醇方式分析

通过高效液相色谱法(蒸发光散射检测器)检测胆固醇含量,并利用面积归一法计算胆固醇去除率, *P. pentosaceus* P4 在 MRS-THIO 培养基中胆固醇去除量为 43.52 μg/mL. 菌株降胆固醇的主要方式为菌体吸收和共沉淀作用,其中菌株通过菌体吸收方式的去除量为 24.45 μg/mL, 占总去除率的 56.18%, 共沉淀方式的去除量为 15.35 μg/mL, 占总去除率的 35.28%, 说明戊糖片球菌 P4 具有在体外通过菌体吸收降胆固醇的能力.

2.3 小鼠体质量

小鼠体质量变化如图 2 所示.

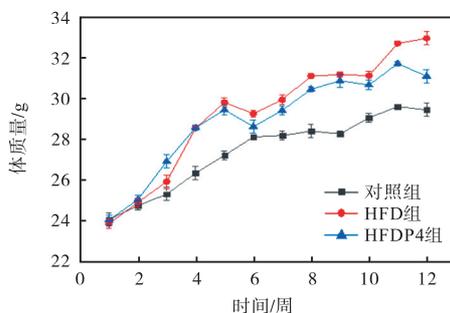


图 2 小鼠体质量变化

Fig. 2 Changes in body weight of mice

对照组、HFD 组与 HFDP4 组小鼠体质量在实验开始时无明显差异,保证了实验初始小鼠体质量处于同一水平;各组小鼠体质量均随时间的延长呈增长趋

势. 喂养 4 周后,高脂饲料组小鼠体质量明显高于正常饲料组小鼠体质量,表明高脂饲料使小鼠体内脂肪堆积. 第 4 周后, HFDP4 组小鼠每天灌胃 0.3 mL 的戊糖片球菌 P4 菌悬液,其他两组灌胃等体积的生理盐水,第 6 周开始 HFDP4 组小鼠体质量有所下降,为 (28.63 ± 0.32) g, 低于 HFD 组. 表明戊糖片球菌 P4 具有降低小鼠体质量的效果.

2.4 小鼠脏器系数

长期高脂饮食易导致机体脂肪含量增加,造成肝脏体积变大,引发脂肪肝. 同时,随着血脂中胆固醇含量的上升,也易引发心血管疾病,造成心脏扩大. 因此,在实验进行 12 周之后,解剖小鼠,取其脏器称量,计算各组脏器系数的差异.

小鼠脏器系数见表 2. 由表 2 可知: 各组间的心脏系数无显著性差异 ($P > 0.05$), 表明实验周期内戊糖片球菌 P4 及高脂饲料未使小鼠的心脏产生病变. HFD 组小鼠的肝脏系数高于对照组、HFDP4 组 ($P < 0.05$), 表明高脂饲料使得脂肪在小鼠肝脏上堆积,造成了小鼠肝脏质量的增加;而 HFDP4 组能够减少脂肪在小鼠肝脏上的堆积,这可能是由于戊糖片球菌与 AMPK 通路介导的通过上调 $PPAR\gamma$ 促进肝脏脂肪分解和下调 SREBP1c、FAS、SCD1 抑制肝脏脂肪生成密切相关^[9].

表 2 小鼠脏器系数

Tab. 2 Organ coefficient of mice

组别	心脏系数	肝脏系数
对照组	0.47 ± 0.01	4.59 ± 0.13
HFD 组	0.47 ± 0.01	5.35 ± 0.14
HFDP4 组	0.48 ± 0.01	4.80 ± 0.07

2.5 小鼠血脂四项

HDL 水平的降低及 TC、TG、LDL 水平的升高都称为血脂异常,这些指标的异常会引发一系列的心脑血管疾病. 图 3 是在 4 周、8 周、12 周时,对照组、HFD 组、HFDP4 组小鼠血清中 TC、TG、HDL-C 和

LDL-C 水平的变化情况.

在第 4 周时, HFD 组与 HFDP4 组血清中的胆固醇含量明显高于对照组, 随着实验时间的延长, 各组胆固醇含量均有所上升, 如图 3(a) 所示. HFDP4 组的胆固醇含量介于对照组及 HFD 组之间, 说明戊糖片球菌 P4 对于高脂饮食小鼠血清中胆固醇含量的升高具有一定的抑制作用. 如图 3(b) 所示, HFD 组的 TG 水平整体呈上升趋势, 而 HFDP4 组的 TG 水平几乎不变, 说明戊糖片球菌 P4 能够稳定高脂饮食小鼠血清中甘油三酯的含量. 如图 3(c) 所示, HFD 组、HFDP4 组小鼠血脂的低密度脂蛋白胆固醇较对照组明显升高, 说明高脂饮食提高了小鼠血脂的低密度脂

蛋白胆固醇水平. 随着实验时间的延长, HFDP4 组小鼠血清中 LDL-C 与 HFD 组相比明显降低, 这说明戊糖片球菌 P4 对于高脂饮食小鼠血清 LDL-C 的升高具有一定的抑制作用. 如图 3(d) 所示, HFD 组和 HFDP4 组血清中的 HDL-C 在第 12 周时基本无差异, 说明随着灌胃的进行, 戊糖片球菌 P4 对于高脂饮食小鼠血清中的 HDL-C 影响很小. HFD 组和 HFDP4 组的高密度脂蛋白含量均呈逐渐上升的趋势, 这可能是由于高脂饮食使小鼠体内产生了大量的胆固醇, 而机体则需要产生更多的高密度脂蛋白来清理体内高水平的胆固醇, 以维持体内的胆固醇处于平衡状态^[10].

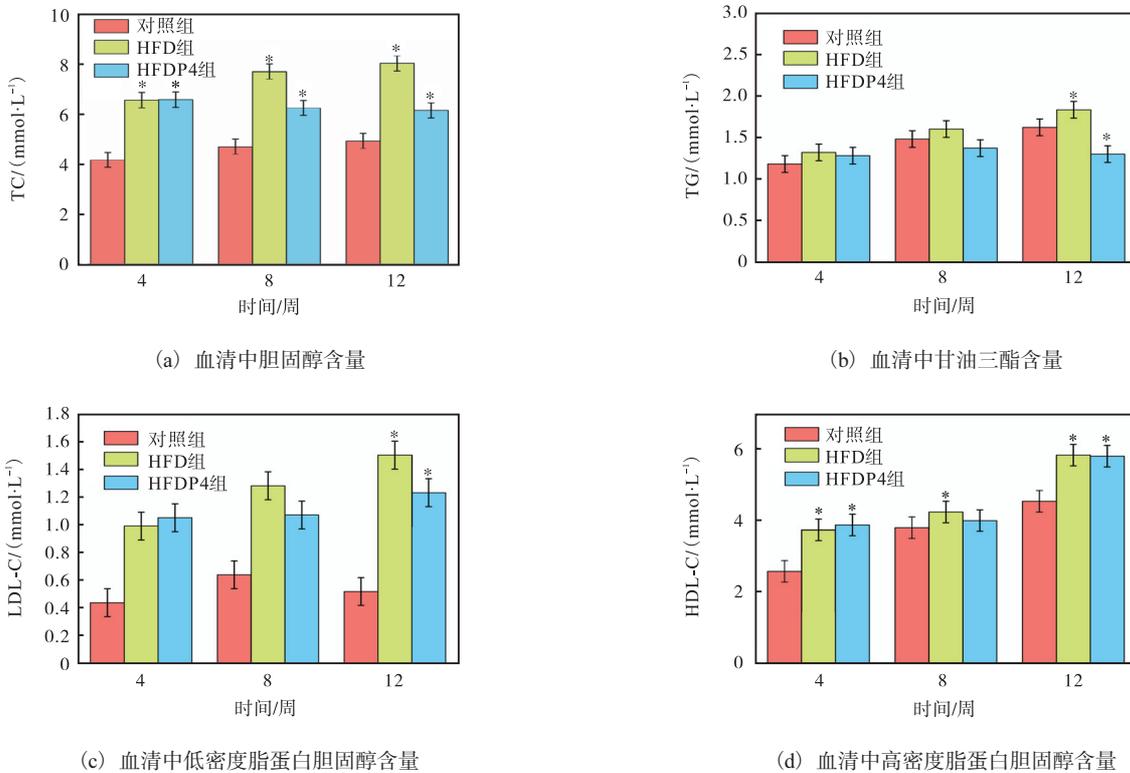


图 3 小鼠血脂水平

Fig. 3 Lipid levels of mice

2.6 小鼠肝脏、粪便中的胆固醇含量

高脂饲料不仅会增加小鼠血脂中胆固醇的含量, 也会造成肝脏中胆固醇含量的增加. 戊糖片球菌 P4 在机体内会通过菌体吸附胆固醇, 被吸附的胆固醇随着粪便排出体外, 因此本实验对小鼠肝脏及粪便中的胆固醇含量进行测定. 小鼠脏器中胆固醇含量见表 3. HFDP4 组肝脏、粪便中的胆固醇含量均低于 HFD 组, 表明戊糖片球菌 P4 能够降低高脂饮食小鼠肝脏、粪便中的胆固醇含量.

表 3 小鼠脏器中胆固醇含量

Tab. 3 Cholesterol content in organs of mice

组别	胆固醇含量/(mol·L ⁻¹)	
	肝脏中	粪便中
对照组	0.84 ± 0.06	0.57 ± 0.02
HFD 组	1.04 ± 0.04	0.99 ± 0.02
HFDP4 组	0.96 ± 0.03	0.75 ± 0.02

2.7 戊糖片球菌 P4 对小鼠肠道菌群的影响

2.7.1 小鼠肠道微生物物种的 α 多样性

α 多样性是指一个特定区域或生态系统内物种

的多样性,常用物种丰度(Chaol 指数、ACE 指数)来表示; 香农-维纳多样性指数(H)和辛普森多样性指数(D)是用来评价群落中 OTU(operational taxonomic unit)多样性水平的群落多样性指数,受样品群落中物种丰度和物种均匀度的影响; 覆盖率(coverage)数值越高,则粪便样品中物种被测出的概率越大,该指数反映测序结果能否代表样本中微生物的真实情况. 由表 4 可见,经戊糖片球菌 P4 灌胃 8 周的 HFDP4 组小鼠肠道的 ACE 指数、Chaol 指数、香农-维纳多样性指数均高于对照组,甚至高于 HFD 组,说明戊糖片球菌 P4 菌体悬浮液能改善小鼠肠道微生物物种的丰度及其多样性.

表 4 肠道微生物物种的 α 多样性
Tab. 4 Alpha diversity of gut microbial species

组别	ACE 指数	Chaol 指数	D	H	覆盖率
对照组	544.88	544	0.93	5.15	0.99
HFD 组	553.25	565.75	0.93	5.61	0.99
HFDP4 组	560.22	572	0.93	5.74	0.99

2.7.2 小鼠肠道微生物的 β 多样性

β 多样性分析能够比较不同样品在物种多样性方面存在的相似程度. 通过分析不同样品的组成可以反映样品的差异和距离,两个样品距离越近,则表示这两个样品的组成越相似^[11]. 由图 4 可知,对照组、HFD 组、HFDP4 组小鼠的肠道菌群能显著分开,说明 3 组的小鼠肠道菌群结构有明显的区别, HFDP4 组对小鼠肠道微生物的物种多样性产生了明显影响.

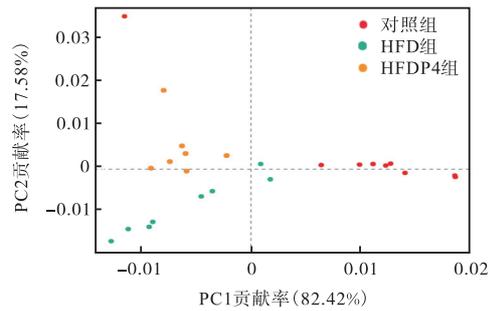
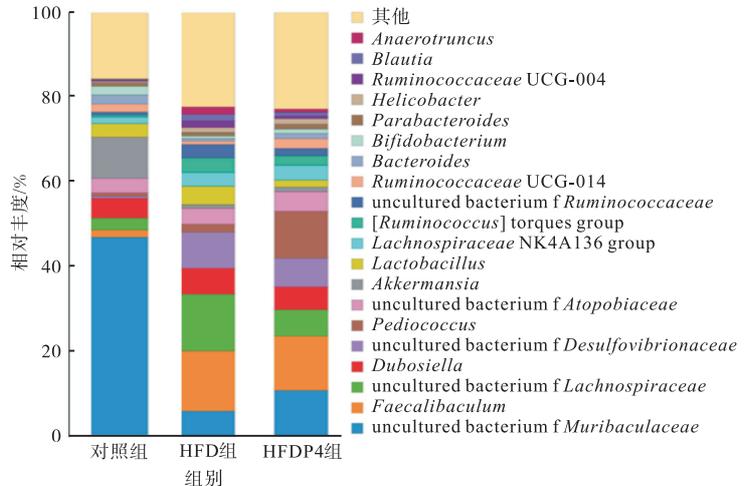
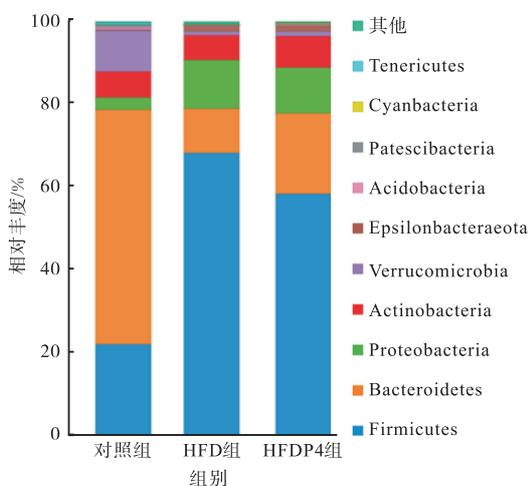


图 4 PCA 分析图
Fig. 4 Diagram of PCA analysis

2.7.3 小鼠肠道微生物物种丰度及其差异性

肠道菌群是一个动态的生态系统,约有 3 500 种属,在成人的肠道菌群中占主导地位的菌是拟杆菌门(Bacteroidetes)和厚壁菌门(Firmicutes)^[12]. 研究表明,厚壁菌门与拟杆菌门的比值是肥胖、高血脂、高胆固醇相关的重要指标,肥胖导致这一比值升高^[13]. 在本研究中,选择门和属这两个水平分析戊糖片球菌 P4 的干预对高脂饮食小鼠肠道菌群变化的影响. 小鼠粪便菌群门、属水平组成如图 5 所示. 由图 5(a)可知:实验小鼠饲养 12 周后,其肠道微生物在门水平上主要是厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)和疣微菌门(Verrucomicrobia). HFD 组小鼠与对照组相比,厚壁菌门与拟杆菌门的比值显著升高. HFDP4 组与 HFD 组相比,*P. pentosaceus* P4 的加入在一定程度上降低了厚壁菌门与拟杆菌门的比值,说明 *P. pentosaceus* P4 对小鼠高脂饮食导致的肥胖有一定的抑制作用.



(a) 小鼠粪便菌群门水平组成

(b) 小鼠粪便菌群属水平组成

图 5 小鼠粪便菌群门、属水平组成

Fig. 5 Phylum and genus level composition of fecal flora of mice

由图 5(b)可知:在属水平上,丰度较高的主要有 S24-7 科 (*Muribaculaceae*)、粪杆菌属 (*Faecalibaculum*)、毛螺菌科 (*Lachnospiraceae*)、杜氏藻属 (*Dubosiella*)。与对照组相比, HFD 组粪杆菌属、毛螺菌科、脱硫弧菌科 (*Desulfovibrionaceae*)、片球菌属 (*Pediococcus*)、毛螺菌科 NK4A136 (*Lachnospiraceae* NK4A136)、瘤胃球菌属 (*Ruminococcus*) 丰度提高; S24-7 科、艾克曼菌属 (*Akkermansia*) 丰度降低,杜氏藻属、阿托波菌科 (*Atopobiaceae*) 丰度几乎没有变化。HFDP4 组小鼠粪便中 S24-7 科、片球菌属的丰度提高,杜氏藻属、阿托波菌科的丰度几乎没有变化。

3 讨论

目前戊糖片球菌在体外降胆固醇的研究主要集中在高效降胆固醇菌株的筛选方面,其具体降解机制研究并不明朗。因此,本研究通过进一步将菌体破碎后检测菌体内外胆固醇含量,解释其降胆固醇机理,除共沉淀方式外,降胆固醇方式还包括菌体吸收方式。

动物实验结果表明,喂食戊糖片球菌 P4 的小鼠体质量小于高脂饲料组,说明戊糖片球菌 P4 能够减少高脂饲料引起的小鼠体内脂肪堆积。脏器系数的变化则显示出高脂饲料使得脂肪在小鼠肝脏上堆积,造成了小鼠肝脏质量的增加,而戊糖片球菌 P4 能够减少脂肪在小鼠肝脏上的堆积,不产生心脏负担。小鼠血脂四项水平及肝脏、粪便中的胆固醇含量显示出戊糖片球菌 P4 能抑制高脂饮食诱导的小鼠血清 TC、TG、LDL-C 水平的升高,能通过菌体吸收降低肝脏、粪便中胆固醇含量。研究^[14]发现,戊糖片球菌 PP04 与 HFD 组相比,对 HDL-C 水平没有明显影响,血清 TC、TG、LDL-C 水平降低,结果与本实验相符。

通过 Illumina MiSeq 平台高通量测序,发现实验组肠道菌群结构显著改变,高脂饮食会降低小鼠肠道微生物丰度,而戊糖片球菌 P4 的加入则提高了肠道微生物的丰度。厚壁菌门在肠道菌群中占主导地位,能更有效地促进营养物质的吸收并引起体质量增加^[15]。而在微生物组中,拟杆菌门与高脂肪和蛋白质的摄入量、碳水化合物的代谢有关^[16]。因此,常以厚壁菌门和拟杆菌门的比值作为判断肥胖的依据。就门水平而言, HFD 组厚壁菌门与拟杆菌门的比值显著升高,引起这一改变的原因是高脂饮食增加了胆汁酸的排泄,间接加大了肠道细菌的选择压力^[17]。HFDP4 组厚壁菌门与拟杆菌门的比值有所下降。Lee

等^[18]研究发现,戊糖片球菌 KID7 灌胃高脂饮食小鼠后,与高脂饮食组相比,厚壁菌门丰度并未改变,拟杆菌门的丰度增加,其厚壁菌门与拟杆菌门的比值有所降低,能够在一定程度上抑制高脂饮食导致的肥胖。在本实验中,戊糖片球菌 P4 对小鼠肠道菌群的影响主要表现为引起体质量增加的厚壁菌门显著减少,与脂肪、蛋白质代谢相关的拟杆菌门显著增加。与 Lee 等^[18]的研究结果相比,本实验中灌胃戊糖片球菌 P4 后,菌群变化更为显著,厚壁菌门与拟杆菌门的比值更低,因此对小鼠肥胖的抑制效果更为明显。此外,戊糖片球菌 P4 的加入明显改善了高脂饮食诱导的小鼠肠道菌群失调,其可能通过调节盲肠中与脂类代谢和炎症相关的 *Mogibacteroides*、*Mucispirillum*、拟杆菌属和粪球菌属的相对丰度而实现。

综上所述,本实验分离的戊糖片球菌 P4 的体外实验证明其通过菌体吸收和共沉淀两种方式降低胆固醇。在高脂饮食小鼠体内,戊糖片球菌 P4 能够降低小鼠体质量、肝脏系数,降低肝脏、粪便中胆固醇含量,抑制高脂饮食诱导的小鼠血清 TC、TG、LDL-C 水平的升高。此外,戊糖片球菌 P4 使高血脂小鼠肠道中厚壁菌门与拟杆菌门的比值上升程度减缓,对高血脂症、肥胖具有潜在抑制作用。

参考文献:

- [1] HASSAN A, DIN A U, ZHU Y, et al. Updates in understanding the hypocholesterolemia effect of probiotics on atherosclerosis[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2019, 103(15): 5993–6006.
- [2] MA C, ZHANG S, LU J, et al. Screening for cholesterol-lowering probiotics from lactic acid bacteria isolated from corn silage based on three hypothesized pathways[J]. International journal molecular sciences, 2019, 20(9): 2073–2085.
- [3] REID G. Probiotics: definition, scope and mechanisms of action[J]. Baillieres best practice and research clinical gastroenterology, 2016, 30(1): 17–25.
- [4] MAJEED M, MAJEED S, NAGABHUSHANAM K, et al. Evaluation of the in vitro cholesterol-lowering activity of the probiotic strain *Bacillus coagulans* MTCC 5856[J]. International journal of food science and technology, 2019, 54(1): 212–220.
- [5] 李云. 乳源酵母发酵牛乳产血管紧张素转换酶抑制肽的研究[D]. 杭州:浙江大学, 2015.

(下转第 69 页)

参考文献:

- [1] SAKTHIVEL V P, SATHYA P D. Single and multi-area multi-fuel economic dispatch using a fuzzified squirrel search algorithm[J]. Protection and control of modern power systems, 2021, 6(1): 1-11.
- [2] CHIANG C L. Improved genetic algorithm for power economic dispatch of units with valve-point effects and multiple fuels[J]. IEEE Transactions on power systems, 2005, 20(4): 1690-1699.
- [3] LIN C E, VIVIANI G L. Hierarchical economic dispatch for piecewise quadratic cost functions[J]. IEEE Transactions on power apparatus & systems, 2007, 103(6): 1170-1175.
- [4] HEMAMALINI S, SIMON S P. Maclaurin series-based Lagrangian method for economic dispatch with valve-point effect[J]. IET Generation transmission & distribution, 2009, 3(9): 859-871.
- [5] 孟安波, 林艺城. 基因编辑差分算法在多燃料经济调度中的应用[J]. 计算机工程与应用, 2018, 54(15): 221-228.
- [6] VO D N, SCHEGNER P, ONGSAKUL W. Cuckoo search algorithm for non-convex economic dispatch[J]. IET Generation transmission & distribution, 2013, 7(6): 645-654.
- [7] 杨明, 胡冠宇, 刘倩. CMA-ES 算法优化网络安全态势预测模型[J]. 哈尔滨理工大学学报, 2017, 22(2): 140-144.
- [8] 陈振宇, 王子悦, 李新宇. 基于引力搜索-粒子群优化算法的电力系统经济调度[J]. 济南大学学报, 2022, 5(1): 1-7.
- [9] 范彩兄, 徐嘉伟, 马润生. 基于模式搜索算法的热电联产经济调度研究[J]. 电气应用, 2022, 41(8): 33-37.
- [10] MENG A, LI J, YIN H. An efficient crisscross optimization solution to large-scale non-convex economic load dispatch with multiple fuel types and valve-point effects[J]. Energy, 2016, 113: 1147-1161.
- [6] 陈霞, 熊智强, 夏永军. 益生菌体外降解胆固醇的研究进展[J]. 工业微生物, 2020, 50(4): 52-58.
- [7] 陈珂可, 朱建国, 姜甜, 等. 具有降解胆固醇能力的益生菌菌株筛选[J]. 食品科技, 2018, 43(11): 7-11.
- [8] CORTES-HERRERA C, ARTVAIA G, LEIVA A, et al. Liquid chromatography analysis of common nutritional components, in feed and food[J]. Foods, 2018, 8(1): 1-63.
- [9] 王宇, 游颖, 田圆, 等. 戊糖片球菌 PP04 通过调节脂质代谢和肠道菌群结构改善高脂饮食诱导 C57BL/6N 小鼠高脂血症[C]//中国食品科学技术学会. 中国食品科学技术学会第十七届年会. 北京: 中国食品科学技术学会, 2020.
- [10] KONG H H, CONLAN S, GRICE E A, et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome[J]. Science, 2009, 324(5931): 1190-1192.
- [11] 李江城, 王小磊, 刘阳, 等. 基于高通量测序数据的微生物检测算法[J]. 北京生物医学工程, 2013(5): 463-466.
- [12] TONG A J, HU R K, WU L X, et al. Ganoderma polysaccharide and chitosan synergistically ameliorate lipid metabolic disorders and modulate gut microbiota composition in high fat diet-fed golden hamsters[J]. Journal of food biochemistry, 2020, 44(1): e13109.
- [13] SCHETZ M, DE J A, DEANE A M, et al. Obesity in the critically ill: a narrative review[J]. Intensive care medicine, 2019, 45(6): 757-769.
- [14] WANG Y, YOU Y, TIAN Y, et al. *Pediococcus pentosaceus* PP04 ameliorates high-fat diet-induced hyperlipidemia by regulating lipid metabolism in C57BL/6N mice[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2020, 68(51): 15154-15163.
- [15] KRAJMALNIK-BROWN R, ILHAN Z E, KANG D W, et al. Effects of gut microbes on nutrient absorption and energy regulation[J]. Nutrition in clinical practice, 2012, 27(2): 201-214.
- [16] DUGAS LR, FULLER M, GILBERT J, et al. The obese gut microbiome across the epidemiologic transition[J]. Emerging themes in epidemiology, 2016, 13: 2.
- [17] 孙海东, 蒋兆彦. 肠道微生态与胆汁酸代谢研究进展[J]. 生命科学, 2016, 28(11): 1405-1409.
- [18] LEE N Y, YOON S J, HAN D H, et al. *Lactobacillus* and *Pediococcus* ameliorate progression of non-alcoholic fatty liver disease through modulation of the gut microbiome[J]. Gut microbes, 2020, 11(4): 882-899.

责任编辑: 郎婧

责任编辑: 郎婧

(上接第 34 页)