

植物乳植杆菌 CCFM8661 对小鼠肠道菌群及肠道屏障的影响

唐宏伟, 刘铭洋, 史晓丹, 李柏良*

(东北农业大学 乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150000)

摘要:为探讨植物乳植杆菌 CCFM8661 对小鼠肠道菌群的影响, 将小鼠适应性培养一周后, 分别用低(1.6×10^6 CFU/只)、中(1.6×10^7 CFU/只)、高(1.6×10^8 CFU/只)剂量的植物乳植杆菌 CCFM8661 灌胃, 干预 14 d。分别检测干预前后小鼠粪便中双歧杆菌、乳杆菌、肠球菌、肠杆菌、产气荚膜梭菌的变化情况, 并测定组织病理、肠道屏障、肠道通透性、短链脂肪酸相关指标, 评价植物乳植杆菌 CCFM8661 对肠道微生物及肠道屏障的调节作用。结果表明, 植物乳植杆菌 CCFM8661 可增加小鼠肠道双歧杆菌及乳杆菌含量并抑制产气荚膜梭菌的增殖; 同时, 喂食植物乳植杆菌 CCFM8661 可明显改变小鼠的肠道通透性、降低肠道中脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)和 D-乳酸的含量、增强肠道屏障、提高肠道中短链脂肪酸(乙酸、丙酸和丁酸)的含量。综上, 植物乳植杆菌 CCFM8661 能够调节肠道菌群, 对肠道屏障具有一定的保护作用。

关键词:植物乳植杆菌 CCFM8661; 肠道菌群; 肠道屏障; 肠道通透性; 短链脂肪酸

Effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 on Intestinal Flora and Barrier of Mice

TANG Hongwei, LIU Mingyang, SHI Xiaodan, LI Bailiang*

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150000, Heilongjiang, China)

Abstract: In order to investigate the effect of *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 on the intestinal flora of mice, mice were acclimatized for one week, gavaged with low (1.6×10^6 CFU/mouse), medium (1.6×10^7 CFU/mouse), and high (1.6×10^8 CFU/mouse) doses of *Lactobacillus plantarum* CCFM8661, and then intervened for 14 d. The changes of bifidobacteria, lactobacillus, enterococcus, Enterobacteriaceae, and *Clostridium perfringens* in the mouse stool were detected before and after the intervention. Histopathology, intestinal barriers, intestinal permeability, and short-chain fatty acids were measured to evaluate the regulatory effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 on intestinal microorganisms and intestinal barriers. The results showed that *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 could increase the content of bifidobacterium and Lactobacillus and inhibit the proliferation of *Clostridium perfringens*. Meanwhile, feeding *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 could significantly change the intestinal permeability of mice, reduce the content of lipopolysaccharide(LPS) and D-lactic acid in the intestinal tract, enhance the intestinal barrier, and raise the content of short-chain fatty acids (acetic, propionic, and butyric acids) in the intestinal tract. In conclusion, *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 was able to regulate the intestinal flora and had a protective effect on the intestinal barrier.

Key words: *Lactobacillus plantarum* CCFM8661; intestinal flora; intestinal barrier; intestinal permeability; short-chain fatty acids

引文格式:

唐宏伟, 刘铭洋, 史晓丹, 等. 植物乳植杆菌 CCFM8661 对小鼠肠道菌群及肠道屏障的影响[J]. 食品研究与开发, 2024, 45(5): 29-35.

TANG Hongwei, LIU Mingyang, SHI Xiaodan, et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 on Intestinal Flora and Barrier of Mice[J]. Food Research and Development, 2024, 45(5): 29-35.

基金项目: 中国博士后科学基金面上项目(2022M721071)

作者简介: 唐宏伟(1999—), 男(汉), 硕士研究生, 研究方向: 食品工程。

*通信作者: 李柏良(1989—), 男(汉), 教授, 博士, 研究方向: 乳品微生物、生物技术。

益生菌作为一种活的微生物具有诸多益生特性,当宿主摄入足够数量的益生菌时,益生菌能够产生诸多正向的益处^[1]。乳酸菌(*Lactobacillus*, LAB)是可发酵碳水化合物中产生大量乳酸的一种细菌的统称,在自然界中极为普遍。乳酸菌是一种安全的革兰氏阳性微生物,广泛应用于各类发酵食品中^[2]。除此以外,乳酸菌也是人体肠道菌群的重要组成部分,具有多种生理功能,包括免疫细胞平衡、代谢产物调节和肠道菌群;乳杆菌属作为乳酸菌的一大类,大多数菌株都具有益生作用^[3-4],其中最具有代表性的乳杆菌为植物乳植杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。

植物乳植杆菌作为优势乳酸菌之一,具有提高机体抗氧化活性、抑制有害菌群生长等多种优良特性,植物乳植杆菌在自然界中分布广泛,常存在于动物肠道内调节微生态平衡,具有增强非特异性免疫功能、预防肠道疾病的作用,同时还可以提供营养因子、促进营养物在肠道内的消化吸收、促进动物的生长发育和提高饲料转化率。植物乳植杆菌 CCFM8661 具有缓解肠细胞铅中毒、有助于排出农药残留等功效^[5-6],在前期的动物实验和临床实验中已经被证实具有良好的益生作用,例如调节肠道微生物群、抗氧化特性、缓解重金属毒性、清除幽门螺旋杆菌等^[4,7]。

本实验以新型益生菌菌株植物乳植杆菌 CCFM8661 为研究对象,研究其对机体的肠道调节作用以及可能的机制,实验过程全程记录并监测小鼠的体质量变化,通过组织病理学分析实验、肠道通透性实验及肠道菌群增殖实验对植物乳植杆菌 CCFM8661 菌株的肠道健康调节效果进行探究,以期为后续的深入研究与应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

选取 48 只 BALB/c 小鼠(体质量均为 22 g 左右)饲养于动物房中,温度设置为 22 ℃,湿度 10%~60%,12 h 明暗交替照明,由小鼠标准饲料喂养,适应性喂养 1 周,自由饮水。喂养 1 周后,将小鼠随机分成 4 组,每组 12 只,进入正式实验。

植物乳植杆菌 CCFM8661 菌粉:微康益生菌(苏州)股份有限公司;DEPC 水(diethyl pyrocarbonate 水)、苏木素伊红染液:生工生物工程(上海)股份有限公司;伊红美蓝琼脂、双歧杆菌(*bifidobacterium*, BBL)琼脂、乳酸杆菌选择性(*lactobacillus selective*, LBS)琼脂、产气荚膜梭菌(*tryptose sulfite cycloserine*, TSC)琼脂:青岛海博生物技术有限公司;D-乳酸检测试剂盒:美国 MP 公司;反转录试剂盒、实时荧光定量多聚核苷酸链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测试剂盒:南京诺唯赞生物科技股份有限公司;

公司;脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒:南京碧云天生物技术有限公司;乙酸标准品、丙酸标准品、丁酸标准品(均≥99%):美国 Sigma-Aldrich 公司;乙酸乙酯(≥99.5%):美国 merck 公司;巴豆酸偏磷酸:美国 Aladdin 公司。

1.1.2 仪器与设备

MLS-3751L-PC 高压蒸汽灭菌器、MDF-382E-80 ℃ 冰箱:日本 Panasonic 公司;Cubis®II 实验室天平:德国 Sartorius 公司;SORVALL ST8/8R 低温离心机:美国 TOMOS 公司;Orbitrap™ Exactive™ 气相色谱质谱联用仪:赛默飞世尔科技公司;SMATBCD Synergy MX 全自动酶标仪:美国 Bio Tek 公司;Tnano-800 核酸蛋白分析仪:上海测博生物科技发展有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及给药

小鼠被随机分为 4 组:阴性对照(normal control, NC)组、植物乳植杆菌 CCFM8661 低剂量组(LP, 1.6×10^6 CFU/只)、植物乳植杆菌 CCFM8661 中剂量组(MP, 1.6×10^7 CFU/只)、植物乳植杆菌 CCFM8661 高剂量组(HP, 1.6×10^8 CFU/只)。其中阴性对照组小鼠灌胃等体积的生理盐水,受试样品给予时间为 14 d。对于植物乳植杆菌 CCFM8661 实验处理组,灌胃药品需要提前配制,分别取一定量的菌粉按照一定浓度溶解在生理盐水中。分组及给药见表 1。

表 1 动物分组及给药
Table 1 Animal grouping and administration

分组	动物数量	饲料量	灌胃剂量(以动物日摄入量计)
阴性对照组(NC)	12	自由采食	相同体积生理盐水
植物乳植杆菌 CCFM8661 低剂量组(LP)	12	自由采食	植物乳植杆菌 CCFM8661 (1.6×10^6 CFU)
植物乳植杆菌 CCFM8661 中剂量组(MP)	12	自由采食	植物乳植杆菌 CCFM8661 (1.6×10^7 CFU)
植物乳植杆菌 CCFM8661 高剂量组(HP)	12	自由采食	植物乳植杆菌 CCFM8661 (1.6×10^8 CFU)

1.2.2 靶标菌培养

收集各组小鼠给药前新鲜粪便于灭菌的塑料离心管中,称取并记录粪便质量,加生理盐水稀释,粪便与生理盐水配比为 0.05 g/mL。稀释后将 1.5 mL 离心管封口,涡旋混匀 7 min。将粪便混悬液按照 10 倍梯度稀释 $10 \sim 10^4$ 倍,接种于培养基中 37 ℃ 培养,培养基种类及其培养条件见表 2。

1.2.3 样品收集

实验结束后使用电子天平记录各组小鼠体质量,

表 2 细菌培养基种类及其培养条件
Table 2 Types of bacterial medium and their culture conditions

细菌	培养基	培养条件	培养时间/h
乳杆菌	LBS 琼脂培养基	需氧,37℃培养	48
双歧杆菌	BBL 琼脂培养基	厌氧,37℃培养	48
肠杆菌	伊红美蓝琼脂培养基	需氧,37℃培养	24
肠球菌	叠氮钠-结晶紫-七叶苷琼脂培养基	需氧,37℃培养	48
产气荚膜梭菌	TSC 琼脂培养基	厌氧,37℃培养	48

将小鼠进行脱颈处理并于眼球处取血,收集血清。收集小鼠小肠组织存放于4%多聚甲醛溶液中固定,等待染色;收集小鼠结肠组织并液氮速冻,用于基因表达量检测;收集小鼠盲肠内容物用于短链脂肪酸含量的检测;收集小鼠血清用于评估肠道通透性。

1.3 指标的测定

1.3.1 小鼠体重测定

测量并记录动物初始体质量以及实验结束时的空腹体质量。

1.3.2 肠道靶标菌菌落计数

按照1.2.2培养后,以菌落形态、革兰氏染色镜检、生化反应等生理生化指标鉴定计数菌落,计算出每克湿便中的菌落数,取对数后进行统计处理。最后一次给予受试样品后24 h,与实验前同样方式取直肠粪便,以同样的方法检测肠道菌群。观察双歧杆菌、乳杆菌、肠球菌、肠杆菌、产气荚膜梭菌含量的变化。

1.3.3 组织病理学观察

将结肠组织固定在10%福尔马林盐水中24 h,然后包埋在石蜡中。切片(厚5 μm)后用苏木素伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色观察肠道病理结构。

1.3.4 肠道屏障 mRNA 表达的测定

取小鼠结肠组织,从肠道样品中提取RNA,利用核酸蛋白分析仪测定肠道屏障mRNA的表达。样品中加入氯仿后培养5 min,4℃下8 000 r/min离心20 min取沉淀。以无酶水为对照测定总RNA浓度,样品的吸光值 A_{260}/A_{280} 控制在1.9~2.1之间。以2 μg cDNA为模板,按照qRT-PCR检测试剂盒配制反应液,用实时荧光定量PCR系统(ABI 7500)进行两步法PCR扩增。根据目的基因的Ct值和内参基因 β -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,通过检测肠道黏蛋白(MUC1和MUC2)和紧密连接蛋白(ZO-1、Occludin和Claudin-1)相关基因的mRNA表达水平来评定肠道屏障。实时荧光定量PCR引物见表3。

1.3.5 肠道通透性的测定

采集的血液在4℃、3 500 r/min下离心10 min,取上清液用于小鼠D-乳酸和LPS含量的检测,具体操作

表 3 qRT-PCR 的引物
Table 3 Primers of qRT-PCR

基因	正向引物序列(5'-3')	逆向引物序列(5'-3')
ZO-1	AACCCGAAACTGATGCTGTGGATGA	CGCCCTTGGAAATGTATGTGGAGAG
Occludin	TTGGCTACGGAGGTGGCTATATGG	CCTTTGGCTGCTCTTGGGCTCTG
Claudin-1	GCTGGGTTTCATCCTCGCTTCTC	CCTGAGCGGTACCATGTTGTC
MUC1	TGAAAGCTTGCCACCATGACCCCGGCA	TAGGATATCTTGTCTCCTACAAGTTGG
MUC2	CGAGCACATCACCTACCACATCATC	TCCAGAATCCAGCCAGCCAGTGC

参照LPS和D-乳酸检测试剂盒的说明书进行操作。

1.3.6 短链脂肪酸含量的测定

称量乙酸、丙酸、丁酸标准品,用乙酸乙酯配制成0.1、0.5、1.5、10.0、20.0、50.0 μg/mL浓度梯度的标准溶液。

准确称取(0.80±0.01)g盲肠内容物,加入乙酸乙酯配制成10%悬浊液,取500 μL悬浊液于1.5 mL离心管中,并加入100 μL巴豆酸偏磷酸溶液,-30℃冻结24 h,解冻后8 500 r/min离心3 min(4℃)去除蛋白质、脂肪等杂质,加入等体积的乙酸乙酯进行提取并振荡混匀2 min,经11 000 r/min离心10 min后,吸取上层有机相并加入终浓度为500 μmol/L的4-甲基戊酸作为内标,混匀后移入进样瓶,用于气相色谱质谱联用(gas chromatography-mass spectrometry,GC-MS)仪检测。气相色谱条件:利用HP-FFAP毛细管柱进行分离,检测器温度设定为250℃,进样量为1 μL。升温程序:起始温度60℃保持3 min,以10℃/min升至200℃,再以30℃/min升至225℃,保持3 min;载气为氮气,载气流速为1.0 mL/min。

1.4 数据处理

数据结果以平均值±标准差表示,用SPSS软件进行方差分析、单因素方差分析, $P<0.05$ 即判定为差异显著。采用GraphPad Prism 8.0软件进行统计学分析,统计多组间比较数据并作图。

2 结果与分析

2.1 植物乳植杆菌CCFM8661对小鼠体质量的影响

植物乳植杆菌CCFM8661对小鼠体质量的影响见表4。

表 4 植物乳植杆菌CCFM8661对小鼠体质量的影响
Table 4 Effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 on body weight of mice

组别	终末体质量/g
NC	24.73±0.31
LP	25.67±0.26*
MP	26.62±0.32**
HP	27.14±0.28**

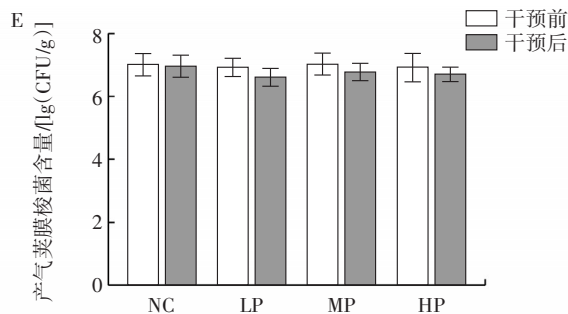
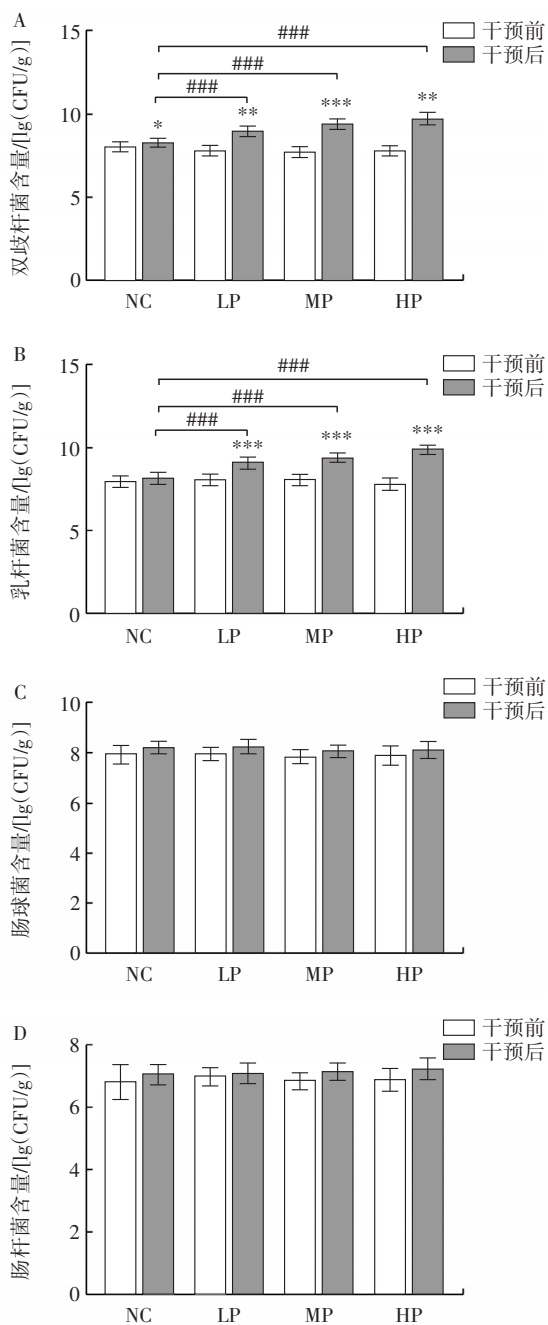
注:*表示与NC组相比差异显著, $P<0.05$;**表示与NC组相比差异极显著, $P<0.01$ 。

由表4可知,在正常菌群状态下,与阴性对照组相比,小鼠体质量随灌胃植物乳植杆菌 CCFM8661 剂量的提升呈现显著增加的趋势($P<0.05$),说明在健康状态下,随着时间的延长及益生菌的摄入,宿主的脾胃功能得到改善,进而出现进食量提高、体质量增加的情况^[2]。

2.2 植物乳植杆菌 CCFM8661 对小鼠肠道菌群的影响

通过为期 14 d 的植物乳植杆菌 CCFM8661 干预,小鼠肠道中双歧杆菌、乳杆菌、肠杆菌、肠球菌、产气荚膜梭菌的变化情况如图 1 所示。

由图 1 可知,粪便中双歧杆菌和乳杆菌的含量在 3 种不同剂量的植物乳植杆菌 CCFM8661 干预后均显著增加($P<0.05$),而肠杆菌、肠球菌和产气荚膜梭菌的



A. 双歧杆菌含量; B. 乳杆菌含量; C. 肠球菌含量; D. 肠杆菌含量; E. 产气荚膜梭菌含量。*表示与干预前相比差异显著, $P<0.05$;**表示与干预前相比差异极显著, $P<0.01$;***表示与干预前相比差异高度显著, $P<0.001$;###表示与阴性对照组相比差异高度显著, $P<0.001$ 。

图1 摄入植物乳植杆菌 CCFM8661 菌株前后小鼠肠道菌群的变化

Fig.1 Changes in intestinal flora of mice before and after ingestion of *Lactobacillus plantarum* CCFM8661

含量在干预前后无显著变化。结合《保健食品功能检验与评价方法(2022版)》中“有助于调节肠道菌群检验方法”中阳性结果判定标准,证明植物乳植杆菌 CCFM8661 具有调节小鼠肠道菌群的作用。刘伟贤等^[3]的研究结果显示,干酪乳杆菌 K56 具有调节肠道菌群的功能,能够显著提高小鼠肠道内益生菌含量,并降低条件致病菌含量,与本研究结果一致。综上,补充适当益生菌,可以通过促进肠道内有益菌(双歧杆菌和乳杆菌)的增加,抑制产气荚膜梭菌的增长,以达到调节肠道菌群的目的^[1]。

2.3 组织病理学分析

对小鼠结肠组织进行 HE 染色,并进行组织病理学切片观察,各组组织学改变见图 2。

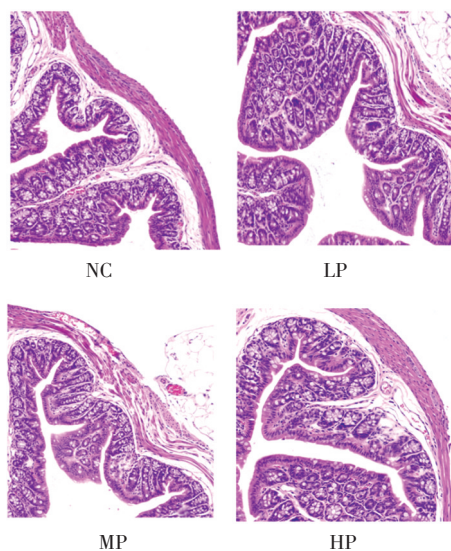


图2 小肠黏膜组织苏木素伊红(HE)染色结果

Fig.2 Hematoxylin eosin (HE) staining results of small intestinal mucosal tissue

由图 2 可知,NC 组结肠组织形态结构完整,结肠黏膜上皮完整,无炎症浸润。各喂养植物乳植杆菌 CCFM8661(低、中、高)组小鼠肠组织 HE 染色结果无明显改变,绒毛排列整齐紧密,粗细均匀,无明显差异。表明植物乳植杆菌 CCFM8661 维持了正常肠道组织结构,并未对小鼠的结肠黏膜组织造成破坏。

2.4 肠道屏障结果分析

植物乳植杆菌 CCFM8661 处理对小鼠结肠中 ZO-1、Occludin、Claudin-1、MUC1、MUC2 mRNA 表达量的影响如表 5 所示。

表 5 植物乳植杆菌 CCFM8661 处理对小鼠结肠中 ZO-1、Occludin、Claudin-1、MUC1、MUC2 mRNA 表达量的影响

Table 5 Effect of treatment with *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 on mRNA expression of ZO-1, Occludin, Occludin-1, MUC1, and MUC2 in mouse colon

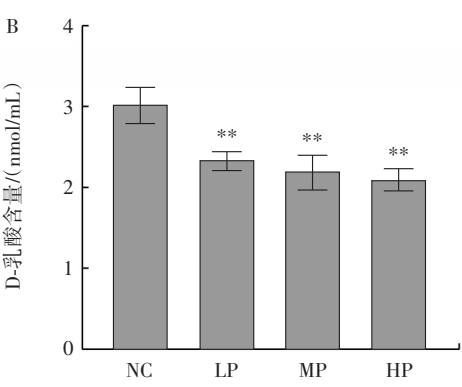
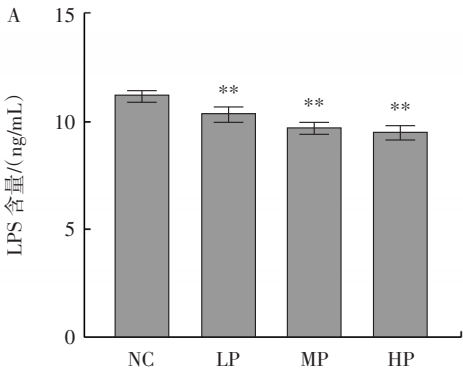
组别	Occludin	Claudin-1	ZO-1	MUC1	MUC2
NC	1.00±0.08	1.00±0.13	1.00±0.11	1.00±0.06	1.00±0.08
LP	1.19±0.13*	1.17±0.23*	1.07±0.05	1.13±0.09	1.08±0.11
MP	1.26±0.16**	1.22±0.14**	1.14±0.12**	1.20±0.12*	1.16±0.09*
HP	1.32±0.09**	1.29±0.15**	1.21±0.13**	1.26±0.10**	1.22±0.13**

注:*表示与 NC 组相比差异显著, $P<0.05$;**表示与 NC 组相比差异极显著, $P<0.01$ 。

由表 5 可知,与阴性对照组相比,植物乳植杆菌 CCFM8661 灌胃组小鼠结肠 Occludin、ZO-1、MUC1、MUC2 与 Claudin-1 mRNA 的表达量均明显增加。随着植物乳植杆菌 CCFM8661 灌胃剂量的增加,mRNA 的表达量也随之增加。表明植物乳植杆菌 CCFM8661 能够通过上调肠上皮细胞间紧密连接蛋白和肠道黏蛋白相关 mRNA 的表达量,达到保护肠道的作用^[8]。

2.5 肠道通透性结果分析

在分子水平上,LPS 和 D-乳酸是检测肠屏障损伤的敏感指标^[9],本研究采用 ELISA 试剂盒检测小鼠血清中 LPS 和 D-乳酸的含量,研究植物乳植杆菌 CCFM8661 对小鼠肠道屏障通透性的影响,结果如图 3 所示。



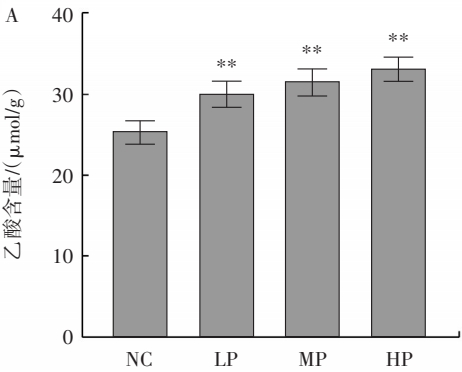
A. LPS 含量;B. D-乳酸含量。**表示与 NC 组相比差异极显著, $P<0.01$ 。

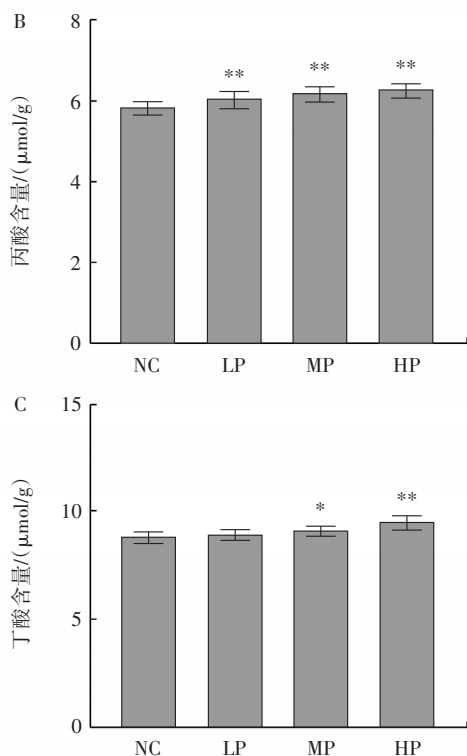
图 3 肠道通透性指标 LPS 和 D-乳酸的测定
Fig.3 Determination of intestinal permeability indexes of LPS and D-lactic acid

由图 3 可知,与阴性对照组相比,植物乳植杆菌 CCFM8661 各处理组 LPS 和 D-乳酸的含量均极显著降低($P<0.01$),这表明植物乳植杆菌 CCFM8661 会导致肠道屏障通透性的降低^[10]。但低、中、高剂量组的 LPS 和 D-乳酸含量均无明显差异。以上结果表明,植物乳植杆菌 CCFM8661 具有良好的降低肠道通透性的效果。

2.6 植物乳植杆菌 CCFM8661 对小鼠结肠内短链脂肪酸含量的影响

由于肠道菌群在调节代谢、机体免疫反应及维持肠道屏障等方面的作用,服用益生菌调节肠道菌群目前被认为是炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)治疗及延缓恶化方面的新方法。短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFAs)除具有调节机体电解质平衡^[11]、刺激胃肠激素分泌、调节肠道动力等功能外,还可以参与宿主免疫反应过程。SCFAs 是肠道中最丰富的菌群代谢物,具有 1~6 个碳原子的脂肪族尾部的羧酸,包括甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、戊酸和己酸,其中乙酸、丙酸和丁酸最丰富^[12]。因此,本研究测定乙酸、丙酸和丁酸含量,探究植物乳植杆菌 CCFM8661 对小鼠结肠内短链脂肪酸含量的影响,结果如图 4 所示。





A. 乙酸含量; B. 丙酸含量; C. 丁酸含量。*表示与 NC 组相比差异显著, $P<0.05$; **表示与 NC 组相比差异极显著, $P<0.01$ 。

图4 植物乳植杆菌 CCFM8661 对小鼠结肠内短链脂肪酸含量的影响

Fig.4 Effect of *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 on content of short-chain fatty acids in mouse colon

由图4可知,与阴性对照组相比,植物乳植杆菌 CCFM8661 的干预可以明显增加乙酸、丙酸和丁酸的含量。结果表明,植物乳植杆菌 CCFM8661 能够调控肠道菌群代谢物,这与其对肠道菌群的调控密不可分。

3 讨论与结论

本研究欲证实植物乳植杆菌 CCFM8661 是否具有调节肠道菌群、改善肠道环境的功效,使用 BALB/c 小鼠来评价植物乳植杆菌 CCFM8661 对肠道菌群和肠屏障的影响。大量研究表明,植物乳植杆菌能够通过调节肠道菌群来缓解便秘^[13-14],人体肠道菌群中双歧杆菌、乳杆菌是有益菌的代表,通过降低肠道内环境的 pH 值、抑制有害菌增殖而发挥作用^[15]。产气荚膜梭菌是致病菌,能分解肌肉和结缔组织中的糖,产生大量气体,导致组织严重气肿,进而影响血液供应,引起气性坏疽^[16]。肠杆菌在相当长的一段时间内被认为是非致病菌,直到 20 世纪中叶,研究人员才发现一些特殊的肠杆菌对人和动物有致病性,会引起严重腹泻和败血症^[17]。因此欲调节肠道菌群并避免其失衡,本实验选用这 5 种代表菌作为评价肠道菌群变化的指标。

结果显示,植物乳植杆菌 CCFM8661 的摄入能显

著改变宿主的肠道菌群,主要是能显著提高宿主肠道内双歧杆菌和乳杆菌的含量($P<0.01$),而对于肠杆菌、肠球菌含量的影响较小,对于产气荚膜梭菌则会降低其含量。阴性对照组干预前后,益生菌(双歧杆菌、乳杆菌)及产气荚膜梭菌含量均增加,但是变化幅度远不及低、中、高剂量组,这可能与动物周龄的增加、肠道容量的提高有关^[18]。结合《保健食品功能检验与评价方法(2022 版)》中的阳性结果判定标准,判定样品调节肠道菌群功能动物实验的结果呈阳性,认为植物乳植杆菌 CCFM8661 具有调节肠道菌群功能。

肠道屏障已成为治疗和预防疾病的重要关注靶标^[19]。大量基于动物模型的研究结果表明,植物乳植杆菌可以显著增强肠道屏障^[20-21]。本研究发现植物乳植杆菌 CCFM8661 可以明显提高小鼠结肠内 Claudin-1、Occludin、ZO-1、MUC1 和 MUC2 的 mRNA 表达水平,结果表明植物乳植杆菌 CCFM8661 可以通过改变紧密连接蛋白和肠道黏蛋白的基因表达量间接改善肠道黏膜屏障的强度。这与之前的研究,植物乳植杆菌 KLDS1.0386 可以上调小鼠肠道上皮中 Claudin-1、ZO-1、MUC1 和 MUC2 的表达,降低结肠通透性的结果一致^[22],证明了植物乳植杆菌 CCFM8661 的添加能够改变小鼠肠道通透性,提高肠道屏障的强度,与阴性对照组相比,低、中、高剂量组肠道中 LPS 和 D-乳酸含量分别下降了 7.70%、13.44%、14.94% 和 22.89%、27.36%、30.24% ($P<0.01$);而在本实验中以高剂量干预小鼠为例,肠道菌群虽发生变化,组织切片观察实验却未见明显效果,因此需进一步验证。

短链脂肪酸(SCFAs)参与人体代谢,在肝脏、骨骼肌、脂肪组织和胰岛等不同器官中具有重要功能,对人体健康起着重要的作用^[23],浓度过低或过高都会对健康产生不利影响。SCFAs 含量受多种因素影响,其中最重要的原因是内源发酵^[24]。细菌生长过程中将难以消化的碳水化合物(膳食纤维)通过一系列代谢反应分解,以满足自身生长的能量需要,产生的 SCFAs 是主要的最终产物^[25],因此维持肠道菌群平衡是调节 SCFAs 含量的重要因素之一。本研究结果证明,植物乳植杆菌 CCFM8661 可以增加肠道内短链脂肪酸的含量,其中低、中、高剂量组肠道中的乙酸、丙酸和丁酸含量分别升高了 18.25%、24.87%、30.61%、3.73%、6.75%、8.34% 和 2.11%、4.01%、7.86%。这与张晨玥等^[26]的结果一致。

综上,植物乳杆菌 CCFM8661 促进了肠道中双歧杆菌和乳酸杆菌生长,抑制了产气荚膜梭菌的增殖。喂食植物乳杆菌 CCFM8661 能显著改变小鼠肠道的通透性,降低肠道中 LPS 和 D-乳酸的含量,增强肠道屏障,增加肠道中短链脂肪酸(乙酸、丙酸和丁酸)的含量。总之后期将针对植物乳植杆菌 CCFM8661 的功效

及安全性进行系统研究,为其在食品中更广泛的应用提供参考。

参考文献:

- [1] MA C C, WASTI S, HUANG S, et al. The gut microbiome stability is altered by probiotic ingestion and improved by the continuous supplementation of galactooligosaccharide[J]. Gut Microbes, 2020, 12(1): 1785252.
- [2] LOOMBA R, SEGURITAN V, LI W Z, et al. Gut microbiome-based metagenomic signature for non-invasive detection of advanced fibrosis in human nonalcoholic fatty liver disease[J]. Cell Metabolism, 2017, 25(5): 1054-1062.e5.
- [3] 刘伟贤,郝婧宇,陈希民,等. 副干酪乳杆菌 K56 调节肠道菌群及润肠通便功能研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(20): 279-284. LIU Weixian, HAO Jingyu, CHEN Ximin, et al. Improvement in intestinal flora regulation and laxative function to *Lactobacillus paracasei* K56[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(20): 279-284.
- [4] WANG J C, BAI X Y, PENG C T, et al. Fermented milk containing *Lactobacillus casei* Zhang and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* V9 alleviated constipation symptoms through regulation of intestinal microbiota, inflammation, and metabolic pathways[J]. Journal of Dairy Science, 2020, 103(12): 11025-11038.
- [5] 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. TIAN Fengwei, ZHAI Qixiao, SUN Yuanyuan, et al. A preliminary study of microbiological properties and applications of *Lactobacillus plantarum* CCFM8661[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2014, 5(4): 1010-1015.
- [6] 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. SUN Xiaofei, WEN Jun. Mechanism and research progress of probiotics regulating intestinal flora[J]. Feed Research, 2010(4): 56-58.
- [7] MOSTAFA S M, BHANDARI S, RITCHIE G, et al. Constipation and its implications in the critically ill patient[J]. British Journal of Anaesthesia, 2003, 91(6): 815-819.
- [8] NATIVIDAD J M M, VERDU E F. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: Pathological and therapeutic implications[J]. Pharmacological Research, 2013, 69(1): 42-51.
- [9] KAWANO M, MIYOSHI M, OGAWA A, et al. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 inhibits adipose tissue inflammation and intestinal permeability in mice fed a high-fat diet[J]. Journal of Nutritional Science, 2016, 5: e23.
- [10] LI F, KANG Z R, WU X J, et al. Rice bran protein oxidation induced by rancidity alters the gut microbiota and intestinal permeability in mice[J]. Food & Function, 2022, 13(9): 5430-5441.
- [11] HUNG T V, SUZUKI T. Short-chain fatty acids suppress inflammatory reactions in caco-2 cells and mouse colons[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(1): 108-117.
- [12] NISHITSUJI K, XIAO J Z, NAGATOMO R, et al. Analysis of the gut microbiome and plasma short-chain fatty acid profiles in a spontaneous mouse model of metabolic syndrome[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 15876.
- [13] 彭芝榕,刘晓梅,倪学勤,等. 植物乳杆菌 F1208 对便秘大鼠胃肠道功能的影响[J]. 食品科学, 2013, 34(13): 243-246. PENG Zhirong, LIU Xiaomei, NI Xueqin, et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* F1208 on gastrointestinal functions in constipated rats[J]. Food Science, 2013, 34(13): 243-246.
- [14] 刘晓梅,彭芝榕,倪学勤,等. 低聚果糖、乳酸杆菌对便秘模型大鼠的通便功能影响[J]. 食品科学, 2013, 34(11): 296-299. LIU Xiaomei, PENG Zhirong, NI Xueqin, et al. Aperient effect of fructooligosaccharides and *Lactobacillus* on constipation model of rats[J]. Food Science, 2013, 34(11): 296-299.
- [15] 余莉,李红,王思平. 肠道菌群与结直肠癌的相关研究进展[J]. 医学综述, 2019, 25(14): 2710-2715. YU Li, LI Hong, WANG Siping. Research progress of gut microbiota and colorectal cancer[J]. Medical Recapitulate, 2019, 25(14): 2710-2715.
- [16] 陈小云,关孚时,张存帅,等. 产气荚膜梭菌主要外毒素最新研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2005, 39(6): 29-33. CHEN Xiaoyun, GUAN Fushi, ZHANG Cunshuai, et al. Recent progress on the major toxins of *Clostridium perfringens*[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2005, 39(6): 29-33.
- [17] MONTALBAN-ARQUES A, SCHARL M. Intestinal microbiota and colorectal carcinoma: Implications for pathogenesis, diagnosis, and therapy[J]. EBioMedicine, 2019, 48: 648-655.
- [18] 徐海滨,严卫星. 保健食品原料安全评价技术与标准的研究简介[J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 16(6): 481-484. XU Haibin, YAN Weixing. Studies on the techniques for safety assessment and standards of raw materials for health foods[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2004, 16(6): 481-484.
- [19] ZAPATA-PÉREZ O, GOLD-BOUCHOT G, ORTEGA A, et al. Effect of Pyrene on hepatic cytochrome P450 1A (CYP1A) expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2002, 42(4): 477-485.
- [20] ZHOU X T, QI W C, HONG T, et al. Exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* NCU116 regulate intestinal barrier function via STAT3 signaling pathway[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(37): 9719-9727.
- [21] LI H X, CHENG S S, HUO J C, et al. *Lactobacillus plantarum* J26 alleviating alcohol-induced liver inflammation by maintaining the intestinal barrier and regulating MAPK signaling pathways[J]. Nutrients, 2022, 15(1): 190.
- [22] SHI J L, DU P, XIE Q G, et al. Protective effects of tryptophan-catabolizing *Lactobacillus plantarum* KLDS 1.0386 against dextran sodium sulfate-induced colitis in mice[J]. Food & Function, 2020, 11(12): 10736-10747.
- [23] GONG L X, CAO W Y, CHI H L, et al. Whole cereal grains and potential health effects: Involvement of the gut microbiota[J]. Food Research International, 2018, 103: 84-102.
- [24] XU Y Q, ZHU Y, LI X T, et al. Dynamic balancing of intestinal short-chain fatty acids: The crucial role of bacterial metabolism[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 100: 118-130.
- [25] TREMAROLI V, BÄCKHED F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism[J]. Nature, 2012, 489(7415): 242-249.
- [26] 张晨玥,马微微,卢慧敏,等. 植物乳杆菌 CCFM 8661 调节肠道菌群及缓解便秘研究[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(18): 58-65. ZHANG Chenyue, MA Weiwei, LU Huimin, et al. *Lactobacillus plantarum* CCFM 8661 to regulate intestinal microbiota and relieve constipation[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(18): 58-65.