

抗生素和高脂饮食对大鼠肠道乳杆菌多样性的影响

白娜 张家超 郑艺 乔健敏 宋宇琴 黄卫强 霍冬雪 侯强川 张和平*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要:【目的】对正常、高脂、抗生素处理大鼠肠道内乳杆菌进行定性和定量分析,比较不同处理组大鼠肠道乳杆菌的多样性。【方法】应用纯培养和非培养技术(16S rRNA 基因序列分析、变性梯度凝胶电泳、实时荧光定量 PCR)对大鼠肠道乳杆菌进行分离鉴定和多样性分析。

【结果】16S rRNA 基因序列同源性分析结果显示,正常组大鼠肠道内分离出的乳杆菌包括约氏乳杆菌(*Lactobacillus johnsonii*)、鼠乳杆菌(*Lactobacillus murinus*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、肠道乳杆菌(*Lactobacillus intestinals*)、动物乳杆菌(*Lactobacillus animalis*)和阴道乳杆菌(*Lactobacillus vaginalis*);但 *L. animalis* 在高脂处理组大鼠肠道内未分离到, *L. intestinals* 和 *L. vaginalis* 在抗生素处理组大鼠中未分离到。DGGE 结果显示 3 个组别大鼠肠道中乳杆菌构成差异明显,同一组内样品间相似性较高;相较于正常组和高脂组,抗生素组的丰度较差;且正常组大鼠肠道内乳杆菌的多样性高于高脂组和抗生素组。q-PCR 结果显示正常组大鼠肠道乳杆菌的数量明显高于高脂组和抗生素组,高脂组的数量也明显高于抗生素组,且 3 个组别之间存在显著差异($P < 0.01$)。【结论】高脂饮食及抗生素的使用会减少肠道内乳杆菌多样性。

关键词: 肠道乳杆菌, 多样性, 分离鉴定, 变性梯度凝胶电泳, 实时荧光定量 PCR

Effect of antibiotics or high-fat diet on diversity of intestinal *Lactobacillus* spp. in rat

BAI Na ZHANG Jia-Chao ZHENG Yi QIAO Jian-Min SONG Yu-Qin
HUANG Wei-Qiang HUO Dong-Xue HOU Qiang-Chuan ZHANG He-Ping*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China)

Abstract: [Objective] This study aimed to investigate the diversity of intestinal *Lactobacillus* in normal diet rats (NDR), high-fat diet rats (HFDR) and antibiotic diet rats (ADR). [Methods] Culture-dependent and culture-independent methods (16S rRNA gene sequencing, DGGE and q-PCR) were applied to isolation, identification and diversity analysis of intestinal *Lactobacillus* in above three groups. [Results] According to the 16S rRNA gene sequencing analysis, *L. johnsonii*, *L. murinus*, *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. intestinals*, *L. animalis* and *L. vaginalis* were isolated from the intestinal of NDR. Whereas *L. animalis* were not able to find in HFDR,

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目(No. 31025019)

*通讯作者: Tel: 86-471-4319940; ✉: hepingdd@vip.sina.com

收稿日期: 2014-01-26; 接受日期: 2014-04-22; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-04-22

L. intestinals and *L. vaginalis* were not isolated from ADR. The DGGE results showed that there was an obvious contrast in the composition of intestinal *Lactobacillus* among 3 groups, and a high similarity in the same group as well. Comparing the richness of *Lactobacillus* in three groups, ADR was the lowest one. Moreover, the intestinal *Lactobacillus* of NDR owed the highest diversity than the others. The q-PCR data indicated that the population of *Lactobacillus* in NDR was higher than that in other two groups, there was a significantly different ($P < 0.01$) among three groups. [Conclusion] The diversity of the intestinal *Lactobacillus* can be reduced with the interference of high-fat diet or antibiotic.

Keywords: Intestinal *Lactobacillus*, Diversity, Isolation and identification, DGGE, q-PCR

肠道菌群在宿主的代谢、营养及保护宿主免受外界侵袭等方面起到非常重要的作用,很多疾病的发生、发展及预防与肠道菌群结构的变化密切相关^[1]。乳杆菌作为人体和动物肠道内定殖且占绝对优势的一类生理活性菌,对宿主健康有十分重要的作用。Haarman等^[2]通过干预性试验发现乳杆菌属对某些疾病的预防及控制发挥着有益作用,如腹泻和过敏性疾病等。Ljungh等^[3]报道乳杆菌可以刺激免疫球蛋白的产生,增强机体的免疫力;还可以通过酸化肠内环境来阻止某些有害菌与肠上皮细胞的黏附,阻碍有害菌在肠道内的定殖,进而优化胃肠功能,减少疾病的发生率。临床上,许多乳杆菌也被用来治疗多种疾病,例如,*L. gasseri* 治疗肠内炎症^[4],*L. casei* 治疗风湿性关节炎^[5],*L. rhamnosus* GG 治疗湿疹^[6],*L. fermentum* 治疗过敏性皮炎^[7]等。

然而,宿主的饮食因素对肠道菌群的构成也有非常重要的影响。正常情况下,肠道菌群与宿主和外部环境保持着平衡状态,当这种平衡在某些情况下被打破时,就会出现肠道菌群失调,表现为肠道菌群在种类、数量、比例、定位和生物学特性上的变化^[8]。Daniel等^[9]报道摄入高脂膳食后会在功能水平上对肠道菌群微生态系统产生显著影响。2010年,张蓉等^[10]指出,高脂饲料可引起小鼠肠道黏膜氧化应激,造成肠道微生物区系紊乱,降低肠道内乳杆菌数量,增加大肠杆菌数量。另外,广谱抗生素作为一种抗菌消炎药被人们广泛应用于临床治疗中,然而抗生素使用不当已成为引起肠道菌群失调的最常见诱因。Guarner等^[11]研究肠道菌群与健康及疾病的关系时指出,盲目滥用抗生素可

使肠道中的有益菌被抑制,肠道的微生态平衡被打破,肠上皮细胞的代谢调节水平和生理功能发生紊乱,导致腹泻、结肠炎、肠壁溃疡、肠穿孔等副反应。临床上常发的抗生素相关性腹泻(Antibiotic-associated diarrhea, AAD)就是由于服用抗生素刺激肠道内难辨梭状芽孢杆菌(*Clostridium difficile*)暴发而导致的^[12]。近些年来,探究肠道微生物与人类健康之间的关系日益成为国际学术界关注的焦点,但是乳杆菌属作为一类重要的益生菌群,基于种的水平上对它们在高脂和抗生素作用下的多样性分析却很少。

本研究通过对大鼠进行正常、高脂和抗生素不同日粮喂养处理,分析不同处理大鼠肠道中乳杆菌的多样性,旨在探讨高脂饮食和抗生素作用对大鼠肠道乳杆菌的影响,为促进相关研究提供基础,积累数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物和饲喂饲料: 本研究所用 24 只 Wistar 大鼠,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。基础饲料(质量比):面粉 20%、米粉 10%、玉米 20%、麸皮 25%、豆料 20%、骨粉 2%、鱼粉 2%、食盐 0.9%、维生素 0.1%;高脂饲料:猪油 10%、蔗糖 10%、基础饲料 80%;抗生素:环丙沙星(10 g/L)。基础饲料和高脂饲料配方均由内蒙古大学实验动物研究中心提供,其中猪油为市售,脂肪含量为 99.5%,供能比为 60%。

1.1.2 主要试剂和仪器: MRS Agar (BD-Difco, USA), MRS broth (Oxide), 10%脱脂乳(质量体积比),

QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN), SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 及 PCR 试剂为 TaKaRa 公司产品, 所用引物及序列(表 1)均由上海桑尼生物科技有限公司合成; 菌株 *Lactobacillus casein* ATCC393^T 购自美国模式培养物集存库 (American type culture collection, ATCC); 变性梯度凝胶电泳仪, Bio-Rad; 普通 PCR 仪和荧光定量 PCR 仪, Applied Biosystems.

1.2 方法

1.2.1 样品采集: 24 只大鼠先进行常规喂养 1 周, 无明显异常后, 随机分为 3 组: 8 只饲喂基础饲料, 为正常组; 8 只饲喂高脂饲料, 为高脂组; 另外 8 只饲喂基础饲料, 并以每只每天 10 mg 的计量灌胃环丙沙星, 为抗生素组。限定每只大鼠每天饲喂 25 g 饲料, 自由饮水, 连续喂养 3 周。采用断颈处死法处死大鼠, 无菌条件下分别刮取每只大鼠的盲肠内容物及肠黏膜, 每只独立作为 1 份样品。

1.2.2 乳杆菌的分离鉴定: (1) 菌株的分离培养: 每份样品各取 1 g 分别于 9 mL 生理盐水中混匀作为 10⁻¹ 稀释液, 然后取 0.5 mL 上一梯度稀释液于 4.5 mL 生理盐水中逐步进行倍比稀释, 直到 10⁻⁵。吸取 10⁻³–10⁻⁵ 稀释液 100 μL 于灭菌 MRS 琼脂培养基上涂布, 37 °C 厌氧培养 48 h。观察菌落形态, 挑取表型特征有代表性的单个菌落进行显微镜观察, 选择革兰氏阳性、过氧化氢阴性分离株进行培养, 并于 10% 灭菌脱脂乳培养基中 -80 °C 保存。

(2) 分离株的鉴定: 采用 SDS-CTAB 液氮反复冻融法^[15] 提取菌株基因组 DNA。将提取的基因组 DNA 稀释到 100 mg/L 左右作为 PCR 扩增模板,

采用细菌通用引物 AD27F 和 AD1495R 进行 16S rRNA 基因 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50 μL 5 μL 10x *Easy Taq* buffer, 4 μL dNTPs, 1.5 μL 模板, 正、反向引物(10 pmol/μL)各 1.5 μL, 0.5 μL *Easy Taq* 酶(5 U/μL), 36 μL ddH₂O。反应条件为 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 58 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物送上海美吉生物医药科技有限公司测序。

(3) 同源性分析: 采用 DNASTar 软件对测序菌株的 16S rRNA 基因序列进行拼接, 在 NCBI 数据库中使用 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 工具与已知细菌的序列进行比对鉴定, 寻找同源性最高的已知分类地位的菌种。

1.2.3 乳杆菌属的 PCR-DGGE: (1) 样品菌群总 DNA 提取: 采用 QIAamp DNA Stool Mini Kit, 按照试剂盒操作说明提取每份样品的细菌宏基因组 DNA。

(2) 乳杆菌属特异性 PCR 扩增: 以 1.2.3(1) 中基因组 DNA 为模板, 采用带“GC 夹子”的乳杆菌属特异性引物 Lac1 和 Lac2-GC 进行 PCR 扩增。反应体系为 50 μL [同 1.2.2(2)], 反应条件为 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 60 °C 45 s, 72 °C 1 min, 35 个循环, 72 °C 5 min。

(3) 变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE): 每组随机挑选 5 只大鼠的 PCR 扩增产物作为代表, 采用 8% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离。变性梯度范围为 35%–55%, 电泳条件为 60 °C、100 V 运行 10 h, 电泳结束后, 参照文献[16]方法进行银染, 扫描成像。

表 1 PCR 扩增引物
Table 1 Primers used for PCR

引物 Primers	寡核苷酸序列 Oligonucleotide sequences (5'→3')	产物大小 Product sizes (bp)	参考 References
AD27F	GCAGAGTTCTCGGAGTCACGAAGAGTTTGTATCCTGGCTCA	1 540	This study
AD1495R	AGCGGATCACTTCACACAGGACTACGGCTACCTTGTTACG		
Lac1	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	380	[13]
Lac2-GC	GCCGCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGCCCGGGGGCACCGGGG G-ATTYCACCGCTACACATG		
LacF	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	98	[14]
LacR	CACCGCTACACATGGAG		

(4) 胶回收条带及测序: 将 DGGE 指纹图谱上的差异性条带和共性条带分别切胶回收, 并浸泡在 100 μL ddH₂O 中 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 48 h, 取 3 μL 上清液作为模板, 使用不带“GC 夹子”的引物, 按 1.2.3(2) 中方法扩增, 产物送上海美吉生物医药科技有限公司测序。

(5) 数据分析: 按照 1.2.2(3) 方法将测定的序列用 BLAST 进行比对。采用 Shannon-Weiner 指数 (H') 和 Simpson 指数 (D) 对 DGGE 凝胶电泳图谱进行 α 多样性分析^[17-18], 其计算公式分别为:

$$H' = -\sum_{i=1}^S p_i \ln p_i, D = 1 - \sum_{i=1}^S p_i^2, p_i = n_i / N。其中,$$

S 为每条泳道中条带总数, n_i 为单一条带 i 的峰面积, N 为所有峰的总面积; 对于 DGGE 来说, p_i 为特定条带亮度相对于所有条带总亮度的比率。DGGE 凝胶图谱中条带的聚类分析采用 Quantity One 软件进行, 经过去除背景强度和设定噪声水平, 软件自动获得一个密度剖面图, 利用条带和条带间的相似度进行分析。

1.2.4 乳杆菌属的实时荧光定量 PCR (q-PCR): 选择已知数量的乳杆菌属参考菌株 *Lactobacillus casein* ATCC393^T, 对其基因组 DNA (100 mg/L) 进行连续 10 倍稀释。将 10^{-1} – 10^{-6} DNA 稀释液作为标准品模板, 同时, 以 1.2.3(1) 中提取的细菌宏基因组 DNA 为样品模板, 并设置阴性对照, 采用特异性引物 LacF 和 LacR 对乳杆菌属的 16S rRNA 基因(多拷贝基因)进行扩增(重复 3 次)。反应体系为 20 μL 2 μL 模板, 正、反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.4 μL , 10 μL SYBR II Mix, 0.4 μL Rox Dye, 6.8 μL ddH₂O。扩增反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,

58 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 50 s。运用 StepOne v2.3 软件制作标准曲线, 以标准曲线为依据, 对未知样品中的乳杆菌属进行定量分析。

2 结果与分析

2.1 16S rRNA 基因序列同源性分析

采用细菌通用引物, 对分离出的 209 株纯培养物进行 16S rRNA 基因 PCR 扩增、测序、序列分析比对后, 获得 79 株乳杆菌, 如表 2 所示。包括约氏乳杆菌(*Lactobacillus johnsonii*) 33 株, 鼠乳杆菌(*Lactobacillus murinus*) 12 株, 嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*) 10 株, 罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*) 9 株, 植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) 6 株, 肠道乳杆菌(*Lactobacillus intestinals*) 5 株, 动物乳杆菌(*Lactobacillus animalis*) 和阴道乳杆菌(*Lactobacillus vaginalis*) 各 2 株。

2.2 PCR-DGGE 分析

对于不同日粮处理大鼠肠道中的乳杆菌属进行特异性 PCR 扩增和 DGGE 分析, 结果发现, 3 个组别大鼠肠道中乳杆菌属构成具有明显差异, 如图 1 所示。DGGE 指纹图谱显示, 条带 a、b、c、d 为 3 组大鼠的共有条带, 条带 e、f、g、h 出现组间差异性; 相较于正常组和高脂组, 抗生素组的丰度较差, 而高脂组除了缺少条带 e 以外, 比正常组和抗生素组还多了 g、h 两条条带。用软件 Quantity One 对 3 个组别大鼠的 DGGE 图谱进行聚类分析, 结果显示正常组、高脂组、抗生素组明显聚为 3 个簇, 表明每组样品间的相似性较高, 各组之间差异性较大, 由于存在个体差异性, 5 号样品未与其它正常组样品聚为一簇, 说明组内样品也存在一定差异。

表 2 分离自 3 组大鼠肠道乳杆菌的种类和数量
Table 2 Species and amounts of *Lactobacillus* isolated from three groups

处理	约氏乳杆菌	鼠乳杆菌	嗜酸乳杆菌	罗伊氏乳杆菌	植物乳杆菌	肠道乳杆菌	动物乳杆菌	阴道乳杆菌
Treatment	<i>L. johnsonii</i>	<i>L. murinus</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. intestinals</i>	<i>L. animalis</i>	<i>L. vaginalis</i>
Normal	18	7	6	4	3	3	1	1
High-fat	9	3	2	3	1	2	–	1
Antibiotic	6	2	2	2	2	–	1	–

Note: –: The strain was not isolated.

挑选条带 a、b、c、d、e、f、g、h 进行切胶回收，再扩增并测序，所得序列比对结果见表 3，这些序列与 GenBank 数据库中最接近的亲缘菌种显示出高达 98% 以上的相似性。其中，只在正常大鼠肠道发现的条带 e 为类似嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus*)，只在高脂大鼠肠道检测到的条带 g、h 为类似不可培养的乳杆菌 (*Uncultured Lactobacillus*)；在正常和高脂大鼠均出现，而抗生素作用大鼠肠道未检测到的条带 f 为类似肠道乳杆菌 (*L. intestinals*)。

不同日粮处理大鼠肠道中乳杆菌的 Shannon-Wiener 指数和 Sampson 指数如表 4 所示。结果显示，3 组大鼠肠道乳杆菌的 α 多样性指数关系为：正常组 > 高脂组 > 抗生素组。可见，正常饮食大鼠的肠道内乳杆菌的多样性高于高脂组和抗

生素组，且抗生素作用的大鼠肠道乳杆菌多样性最低，但各组数据差异并不显著。

2.3 q-PCR 分析

乳杆菌属的定量 PCR 标准曲线及结果如图 2 所示，标准曲线方程为 $Y = -3.171X + 38.286$ ，相关系数 $R^2 = 0.998$ 。相关系数达到了 0.99 以上，满足后续试验要求。以标准曲线为依据，计算出不同日粮处理大鼠肠道内乳杆菌属的基因拷贝数，正常组大鼠平均达到 $(1.73 \pm 0.82) \times 10^6$ copies/g feces，高脂组大鼠平均达到 $(9.17 \pm 1.69) \times 10^5$ copies/g feces，抗生素组大鼠平均达到 $(1.63 \pm 1.18) \times 10^5$ copies/g feces，可见 3 组大鼠肠道内乳杆菌属的数量也存在这样的数量关系。由试验结果可知，正常组大鼠乳杆菌的数量明显高于高脂组和抗生素组，而高脂组的数量也明显高于抗生素组，且 3 个组别之间存在显著差异 ($P < 0.01$)。

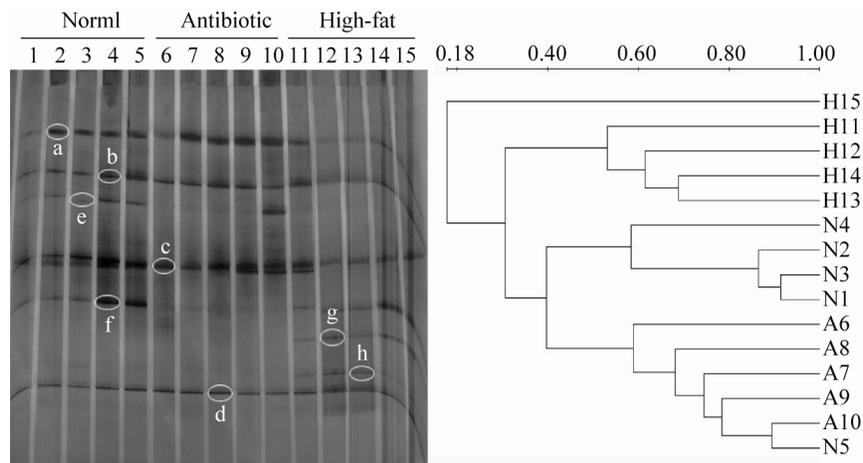


图 1 DGGE 指纹图谱及聚类图

Figure 1 DGGE profile and clustering dendrogram

表 3 DGGE 胶回收条带测序结果

Table 3 Sequencing results of DGGE bands

挑选条带 Selected band	最近种属 Closest relative	相似度 Similarity (%)	片段大小 Size (bp)	登录号 Accession number
a	<i>L. johnsonii</i>	98	292	KF478832.1
b	<i>L. murinus</i>	98	295	KC878286.1
c	Uncultured <i>Lactobacillus</i>	99	291	JN692552.1
d	<i>L. reuteri</i>	100	298	CP006603.1
e	<i>L. acidophilus</i>	99	293	HG518159.1
f	<i>L. intestinals</i>	98	293	FR683097.1
g	Uncultured <i>Lactobacillus</i>	99	296	EF587940.1
h	Uncultured <i>Lactobacillus</i>	99	293	EF597115.1

Normal	Shannon	Simpson	Antibiotic	Shannon	Simpson	High-fat	Shannon	Simpson
1	1.94	0.86	6	1.60	0.80	11	2.28	0.90
2	2.17	0.88	7	2.08	0.87	12	2.19	0.89
3	2.19	0.89	8	2.19	0.89	13	2.30	0.90
4	2.37	0.91	9	1.94	0.86	14	1.93	0.85
5	2.28	0.90	10	2.05	0.87	15	1.59	0.79
Average	2.19	0.89	Average	1.97	0.86	Average	2.06	0.87

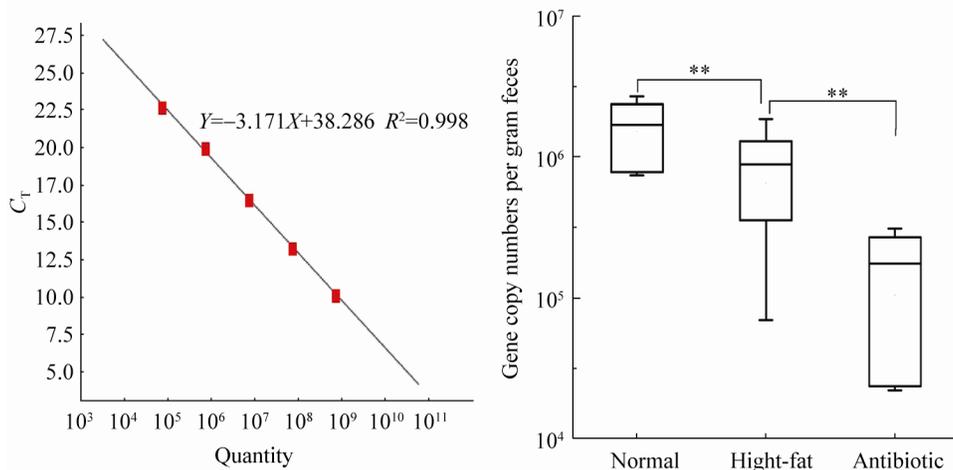


图 2 乳杆菌属 q-PCR 标准曲线及三组大鼠乳杆菌定量结果

Figure 2 Standard curve and results of q-PCR of *Lactobacillus* from three groups

Note: Asterisks indicate the statistical significance. **: $P < 0.01$.

3 讨论

肠道包括大肠和小肠,其中小肠可分为十二指肠、空肠和回肠,大肠可分为盲肠和结肠等。小肠是肠道菌群的一个过渡区,尽管从十二指肠到回肠的菌量逐渐增加,但是,由于其蠕动强烈、肠液流量大,回肠的总菌数仅达 10^3 – 10^7 个,且以双歧杆菌、拟杆菌等严格厌氧菌为主。而大肠是食物停滞的主要部位,是细菌大量存在的部位,结肠内菌量达 10^{11} – 10^{12} ,远远多于小肠内的菌群数量,且大肠中的菌群多以厌氧菌或兼性厌氧菌为主,如乳杆菌属、肠杆菌属等^[19-20]。另外,据李景等^[21]研究报告,小鼠盲肠肠段的乳杆菌数量大于结肠肠段。因此,本研究选择大鼠盲肠内容物及肠黏膜作为研究对象,分析其肠道乳杆菌属的多样性具有一定代表性。

肠道微生物区系的平衡和稳态的保持是肠道菌群发挥正常生理功能的基础,平衡的打破伴随着菌群结构和数量的变化。本研究显示,高脂饮食和抗生素作用对于大鼠肠道乳杆菌的构成具有明显影响。从 16S rRNA 基因分离鉴定和 q-PCR 定量结果中可以看出正常饮食状态大鼠肠道乳杆菌的种类和数量显著高于高脂组和抗生素组。这一结论与诸多学者的研究结果相符合^[22-23]。从 PCR-DGGE 定性角度来分析,也可以看出 3 种日粮处理大鼠肠道乳杆菌在种水平上的差异,显示抗生素组大鼠的肠道乳杆菌丰度差于正常组和高脂组大鼠,且多样性也较差。另外,只在高脂组中检测到的两种不可培养的乳杆菌,可能是由于肠道菌群在高脂环境下的生存选择性压力导致的,而其本来并不存在于大鼠肠道中。

饮食是决定肠道菌群结构和功能的重要因素,饮食结构的改变可使肠道微生态系统发生长期而持续的改变。Resta^[24]报道肠道菌群赖以生存的养料主要来自于碳水化合物,而高脂饲料中脂类成分的增多使肠道菌群的养分来源相对减少,这可能成为菌群失衡、数量下降的主要原因。此外,Matias等^[25]还指出脂类代谢过程中产生的一些副产物,如次级胆酸、硫化氢等,可损害肠黏膜屏障,导致黏膜产生炎症反应等不良变化,从而破坏菌群赖以生存的微环境。因此可见,饲喂高脂饲料的大鼠可能是因为饮食结构的改变导致肠道乳杆菌营养缺乏、生存环境恶化而出现数量减少。

对于抗生素组大鼠肠道乳杆菌多样性降低的原因显然归咎于抗生素的使用。抗生素是一类能抵抗致病微生物的药物,当由于某些原因导致致病菌或条件致病菌在肠道内大量增生,宿主健康受影响时,可以针对致病菌,通过药敏试验,选用敏感的抗生素,抑制甚至杀死有害菌。但是,抗生素抗菌谱过长,长时间应用,在杀死致病菌的同时,也会大量杀灭体内有益细菌,包括免疫菌,而使耐药菌趁机在体内繁殖生长,引起菌群失调导致二重感染或多重感染。尽管有学者在正常人肠道乳杆菌对抗生素的耐受性研究中指出,乳杆菌对环丙沙星高度耐受^[26],但在长期抗生素压力下,肠道微生态环境仍会遭到破坏,乳杆菌失去肠道原籍菌的定殖抗力,从而导致其多样性改变。王瑞君等^[23]采用抗生素诱导胃肠道菌群失调建立动物模型时指出,抗生素可使小鼠肠黏膜水肿、上皮严重脱落、肠间质充血。据 Dethlefsen 和 Relman^[27]的研究报道,抗生素的反复扰动还会导致肠道菌群多样性恢复不完全,甚至会破坏对人类健康有益的共同进化的微生物群落的完整性。可见,抗生素对微生物的抑制或杀灭作用可能是导致大鼠模型肠道乳杆菌多样性降低的关键因素。

影响宿主肠道菌群结构的因素包括基因型、饮食、年龄、性别和环境等多个方面^[28-29]。对于遗传背景相同的宿主而言,饮食因素对肠道菌群的影响

最直接、最大^[30],因此,对于本研究中 PCR-DGGE 聚类分析得出的组内样品聚为一簇、组间样品分支聚集的结果,就是由于大鼠摄入高脂膳食和灌胃抗生素导致的。另外,据 Zoetendal 等^[31]报道,不同个体肠道菌群还具有很强的宿主特异性,即使生活在相同环境、具有相同饮食习惯的配偶,他们的肠道菌群也会显示出一定的差异性。尹业师等^[32]运用 DGGE 技术对影响实验小鼠肠道菌群的多种因素进行比较研究时也指出,个体差异的存在对肠道菌群的聚类也有较大影响。因此,本研究的 PCR-DGGE 聚类结果中正常组的一个样品出现聚类差异的原因可能就是不同个体具有的宿主特异性和个体差异性导致的。

综上所述,高脂饮食和抗生素作用可导致肠道乳杆菌菌群多样性减少。乳杆菌作为体内最重要的益生菌之一,定殖在肠道内构成了肠道的生物屏障,对于机体的健康起着尤为重要的作用,我们应该重视日常膳食结构的合理性以及抗生素使用的规范性。

参 考 文 献

- [1] Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2009, 9: 313-323.
- [2] Haarman M, Knol J. Quantitative real-time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotic infant formula[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(4): 2359-2365.
- [3] Ljungh A, Wadstrom T. Lactic acid bacteria as probiotics[J]. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 2006, 7(2): 73-89.
- [4] Carroll IM, Andrus JM, Bruno-Bárcena JM, et al. Anti-inflammatory properties of *Lactobacillus gasseri* expressing manganese superoxide dismutase using the interleukin 10-deficient mouse model of colitis[J]. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2007, 293(4): 729-738.
- [5] So JS, Lee CG, Kwon HK, et al. *Lactobacillus casei* potentiates induction of oral tolerance in experimental arthritis[J]. *Molecular Immunology*, 2008, 46(1): 172-180.
- [6] Wickens K, Black PN, Stanley TV, et al. A differential effect of 2 probiotics in the prevention of eczema and atopy: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2008, 122(4): 788-794.

- [7] Weston S, Halbert A, Richmond P, et al. Effects of probiotics on atopic dermatitis: a randomised controlled trial[J]. Archives of Disease in Childhood, 2005, 90(9): 892-897.
- [8] 尹军霞, 林德荣. 肠道菌群与疾病[J]. 生物学通报, 2004, 39(3): 26-28.
- [9] Daniel H, Moghaddas GA, Berry D, et al. High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice[J]. The ISME Journal: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology, 2014, 8(2): 295-308.
- [10] 张蓉, 孙进, 李亚欣, 等. 硫酸对高脂日粮小鼠肠道氧化还原状态与微生物菌群的影响[J]. 食品工业科技, 2010, 31(9): 321-324.
- [11] Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease[J]. The Lancet, 2003, 361(9356): 512-519.
- [12] Gould CV, McDonald LC. Bench-to bedside review: *Clostridium difficile* colitis[J]. Critical Care, 2008, 12(1): 203-210.
- [13] Endo A, Futagawa-Endo Y, Dicks LMT. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* diversity in horse feces, revealed by PCR-DGGE[J]. Current Microbiology, 2009, 59(6): 651-655.
- [14] Liu XF, Zou QH, Zeng BH, et al. Analysis of fecal *Lactobacillus* community structure in patients with early rheumatoid arthritis[J]. Current Microbiology, 2013, 67(2): 170-176.
- [15] Yu J, Sun ZH, Liu WJ, et al. Phylogenetic study of *Lactobacillus acidophilus* group, *L. casei* group and *L. plantarum* group based on partial *hsp60*, *pheS* and *tuf* gene sequences[J]. European Food Research and Technology, 2012, 234(6): 927-934.
- [16] 徐洁. 四川地区不同年龄健康人肠道菌群的比较研究[M]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2012.
- [17] Wang M, Karlsson C, Olsson C, et al. Reduced diversity in the early fecal microbiota of infants with atopic eczema[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2008, 121(1): 129-134.
- [18] 许晴, 张放, 许中旗, 等. Simpson 指数和 Shannon-Wiener 指数若干特征的分析及“稀释效”[J]. 草业科学, 2011, 28(4): 527-531.
- [19] 徐志毅. 肠道正常菌群与人体的关系[J]. 微生物学通报, 2005, 32(3): 117-120.
- [20] 张日俊. 消化道微生物与宿主营养素的吸收和代谢研究[J]. 中国饲料, 2003(2): 11-14.
- [21] 李景, 王素英, 师德强. 螺旋藻对腹泻模型小鼠肠道菌群的影响[J]. 微生物学通报, 2009, 36(2): 187-192.
- [22] Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity[J]. Nature, 2006, 444(7122): 1022-1023.
- [23] 王瑞君, 黄雪峰, 唐欢, 等. 抗生素诱导的胃肠道菌群失调动物模型的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(3): 145-149.
- [24] Resta SC. Effects of probiotics and commensals on intestinal epithelial physiology: implications for nutrient handling[J]. The Journal of Physiology, 2009, 587(17): 4169-4174.
- [25] Matias SAR, Nava GM, Muellner MG, et al. DNA damage and toxicogenomic analyses of hydrogen sulfide in human intestinal epithelial FHs 74 Int cells[J]. Environmental and Molecular Mutagenesis, 2010, 51(4): 304-314.
- [26] 许英烈, 于倩, 陈欣. 正常人肠道乳杆菌对抗生素的耐受性研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(7): 1365-1366.
- [27] Dethlefsen L, Relman DA. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 108(S1): 4554-4561.
- [28] Mueller S, Saunier K, Hanisch C, et al. Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(2): 1027-1033.
- [29] McKnite AM, Perez-Munoz ME, Lu L, et al. Murine gut microbiota is defined by host genetics and modulates variation of metabolic traits[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e39191.
- [30] 张家超, 郭壮, 孙志宏, 等. 益生菌对肠道菌群的影响—以 *Lactobacillus casei* Zhang 研究为例[J]. 中国食品学报, 2011, 11(9): 58-68.
- [31] Zoetendal EG, Akkermans ADL, Akkermans-van Vliet WM, et al. The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract[J]. Microbial Ecology in Health and Disease, 2001, 13(3): 129-134.
- [32] 尹业师, 王欣. 影响实验小鼠肠道菌群的多因素比较研究[J]. 实验动物学, 2012, 29(4): 12-18.