

益生元精准化研究进展

吴少辉, 魏远安*, 吴嘉仪, 郑惠玲, 霍金洪

(量子高科(中国)生物股份有限公司技术中心, 广东 江门 529081)

摘要: 益生元在调节肠道菌群方面一直发挥着重要的作用。越来越多的研究数据、临床实验结果和报告表明益生元在预防和干预治疗肠易激综合征、糖尿病、肥胖症等慢性代谢和免疫系统疾病方面均具有有益的效果。纵观精准营养的发展趋势, 可以预见益生元将对新兴的微生态健康医疗产业产生重要影响。本文通过回顾益生元最新的研究发现和功能作用范例, 着重探讨益生元概念的演变。对益生元生理作用机制的深入认识有助于定义和发展精准营养分支之一的“精准益生元”概念。因此, 有必要对益生元的特性、组成和结构进行更深入的研究, 进一步探索益生元、细菌种类、特定生理功能三者之间的关系。另外, 在细胞生物学分子水平层面上明确益生元的作用机制将有助于定制个性化益生元配方和营养摄入方案, 从而促进与保障人类健康。

关键词: 益生元; 精准化; 精准营养; 研究进展

Precision Prebiotics: Progress and Trends

WU Shaohui, WEI Yuanan*, WU Jiayi, ZHENG Huiling, HUO Jinhong

(Technical Center, Quantum Hi-Tech (China) Biological Co. Ltd., Jiangmen 529081, China)

Abstract: Prebiotics play a significant role in regulating the intestinal microbiota. Increasing amounts of research data, clinical trial results, and widespread reports have documented the beneficial effects of prebiotics in the prevention and interventional treatment of chronic metabolic and immune diseases, such as irritable bowel syndrome, diabetes, and obesity. Taking into consideration of the development trend of precise nutrition, it is foreseeable that prebiotics will have a significant impact on the emerging industry of microbiota (or microecological) health care. This paper reviews the latest research findings and presents a functional paradigm of prebiotic action with focus on the evolving concept of prebiotics. A better understanding of the physiological mechanisms involved can help to define and develop the concept of ‘precision prebiotics’ that represents an outgrowth of precise nutrition. This highlights the necessity of studying the properties, components, and structures of prebiotics and exploring the relationship among prebiotic composition, bacterial species and physiological functions. Moreover, ascertaining the mechanism of action of prebiotics at the molecular level of cell biology will help with personalized prebiotic formulation and nutritional intake plan that enhance and ensure the health of each individual.

Keywords: prebiotic; precision; precision nutrition; research progress

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201809048

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2018) 09-0333-08

引文格式:

吴少辉, 魏远安, 吴嘉仪, 等. 益生元精准化研究进展[J]. 食品科学, 2018, 39(9): 333-340. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201809048. <http://www.spkx.net.cn>

WU Shaohui, WEI Yuanan, WU Jiayi, et al. Precision prebiotics: progress and trends[J]. Food Science, 2018, 39(9): 333-340. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201809048. <http://www.spkx.net.cn>

精准营养是通过对个体的遗传特征、肠道微生态、代谢特征、生理状态、生活方式以及临床指标等相关因素对营养需求和干预效果进行关联分析, 得到它们之间的相互影响统计规律, 以此指导和实现对个体营养状态的最优化选择、判别和干预^[1-2]。

收稿日期: 2017-05-11

第一作者简介: 吴少辉 (1986—), 男, 工程师, 硕士, 研究方向为碳水化合物化学及生产技术。E-mail: wush@qht.cc

*通信作者简介: 魏远安 (1963—), 男, 教授, 博士, 研究方向为碳水化合物化学、糖酶生物化学及其应用。

E-mail: yawei@qht.cc

益生元是现代肠道功能、微生态调节的重要功能因子, 是许多慢性代谢性疾病的预防、干预手段之一。益生元的安全性和肠道菌群调节功能等已被大量的现代科学实验证明, 但由于整个肠道菌群的复杂性和益生元结构的多样性, 单一成分纯化、生产困难, 研究手段、方

法缺少、滞后,其发展速度相对缓慢,临床科学研究更是遭遇瓶颈。

近年来越来越多的研究表明:人体共生微生物对人体健康存在有益的影响,尤其是对宿主的代谢表型具有调节作用,在很多代谢性疾病(例如糖尿病,肥胖等)的发生和发展过程中起着重要的作用。目前,对于人体肠道微生物的研究已经从以实验室研究为主逐步发展到采用特定益生元进行预防干预的临床验证阶段。通过研究人体肠道微生物菌群,了解人类微生物菌群分布和菌群与益生元相互影响因素,确定了益生元对人体代谢性疾病、免疫系统疾病等的预防、干预治疗方案,并在临床上取得了良好效果,这进一步显示了益生元产品在今后的微生态健康医疗产业中具备极大的发展潜力。

伴随着宏基因组学、代谢组学、蛋白质组学的发展和大数据分析方法的进步,基于个体特征的精准益生元概念和益生元临床应用逐渐形成,预期将成为今后益生元学发展的重要方向。那么什么是精准益生元,如何实现益生元的精准化应用?本文将讨论和分析国际上益生元的一些最新研究成果,提出对益生元精准化发展的研究方向和展望。

1 益生元概念的演进和精准益生元时代的开启

关于益生元,自1995年英国Reading大学的Gibson等^[3]提出后,其定义一直在不断发展和演进。在2010年,国际益生菌和益生元科学协会定义膳食益生元为“选择性发酵的成分,它能使胃肠微生物的组成和/或活性产生特定变化,进而有利于宿主的健康”^[4]。随着研究技术的提高以及人们对益生元、肠道菌群、肠道功能、肠道免疫功能等的再认识,Bindels等^[5]提出将益生元进一步定义为“一种不被消化的混合物,通过肠道微生物的代谢,调节肠道微生物组成和/或活性,从而赋予宿主有益的生理影响”。有别于传统的益生元特异性刺激双歧杆菌等某种益生菌概念,Bindels等^[5]提出的最新概念呼吁益生元作用要关注到整个微生态的结构与功能的变化,更广泛地关注有益于人体健康的物质。全球市场上有多个作为益生元的碳水化合物产品,但迄今只有4个是有良好人体实验数据支持的,即菊粉、低聚果糖、低聚半乳糖和合成二糖——乳果糖,其他功能性低聚糖目前被列为可能的候选益生元。国内外研究表明,益生元具有增殖有益菌、抑制有害菌、调节肠道菌群、增强免疫力、润肠通便、促进矿物质吸收的作用,对结肠癌、炎症性肠道疾病和急性感染具有有益的影响^[6-7]。然而,益生元的临床证据表明相同益生元对不同人群效果不一,这可能是由于不同人群的肠道菌群具有特异性,益生元不仅能特异性增殖双歧杆菌、乳酸杆菌,还能改变整个肠道菌群微

生态,致使存在个性化效应。同时,大部分益生元为混合物,对人体有健康效益的具体成分及作用机理还不明确。

精准益生元是通过益生元的物理化学性质、成分、结构、生理作用机制的研究和深刻理解,以现代精准营养的规律和要求为指导,针对不同人群或个体的菌群、代谢、营养特征和需求,以独立或协同作用的方式,实现益生元在微生态健康产品、生物医药研发、医疗服务上的精准化定制和科学配方。

要实现上述精准益生元的科学应用,至少必须在以下几个层面上对各种特定的益生元进行进一步的深入研究:

1) 在细胞生物学、分子生物学的层面上,研究、阐明特定益生元的直接生理功能机制,为进一步指导和应用该益生元提供坚实的科学基础;2) 分离、纯化单一化学组分的益生元,在此基础上进行单一组分益生元的功效研究,建立该组分益生元“结构-菌群-功能”方面的对应关系,为单组分益生元向药物研究和临床应用提供精准的依据;3) 以自然界最好的天然多组分益生元——母乳中的低聚糖为模板和参照,研究母乳低聚糖(human milk oligosaccharides, HMOs)的组成和各组分在泌乳期的动态变化,并结合母婴肠道微生态状况、膳食营养和身体发育健康状况等进行大样本、大数据收集、分析,总结出其中相关因素的关联统计规律,以此为各种特定益生元的精准复配和协同应用提供科学的配比、剂量等方面的指导。

2 益生元精准化研究进展

2.1 益生元的直接生理功能机制

益生元对健康的促进作用一直被认为是通过增殖双歧杆菌等有益菌或者充当抗黏附抗菌剂而发挥间接作用^[4,8-9]。乳酸杆菌和双歧杆菌等有益菌能利用益生元,从而提高与有害菌争夺有限的营养物质的竞争优势;同时它们会代谢产生短链脂肪酸,例如乙酸盐、丙酸盐和丁酸盐等,以创造一个带酸性的微环境来抑制有害菌的生长^[9]。另外,特定的益生元能直接充当抗黏附抗菌剂来阻止或减少病原菌在黏膜上的黏附^[10]。例如,致病性大肠杆菌会表达一种低聚糖黏附素,能与黏膜细胞表面糖链结合从而黏附在黏膜上,而低聚半乳糖则与黏膜细胞表面的糖链结构相似,作为可溶性的受体与大肠杆菌结合,以抑制大肠杆菌在肠道的黏附,减少感染的风险^[11]。然而在细胞生物学、分子生物学的层面上,鲜有研究阐明益生元的直接生理功能机制。

最新研究发现,益生元能诱导基因差异性表达和调节细胞应答,对宿主肠道上皮细胞发挥直接作用。

Vogt等^[12]研究发现 β (2 \rightarrow 1) 果聚糖能有效保护人类肠道上皮T84细胞的屏障, 并发现Toll样受体2 (Toll-like receptor-2, TLR2) 很可能是 β (2 \rightarrow 1) 果聚糖产生保护效应的靶点。该研究通过加入4种不同链长组合的 β (2 \rightarrow 1) 果聚糖培养T84细胞, 以丙二醇甲醚醋酸酯 (2-acetoxy-1-methoxypropane, PMA) 处理细胞层作为肠上皮屏障破坏模型, 以不作处理的细胞作为空白对照, 测定T84细胞层的跨膜电阻 (transepithelial electrical resistance, TER) 来评价肠上皮屏障功能。结果发现, PMA组TER为空白对照组 (100%) 的 (61.5 \pm 5.8) %, 聚合度3~10的果聚糖组 (先经糖处理后经PMA处理) 为 (91.0 \pm 6.6) %, 能有效缓解PMA导致的TER降低 ($P<0.001$), 而更高聚合度的果聚糖则没有观察到显著的缓解作用。为了证明 β (2 \rightarrow 1) 果聚糖的保护效应与TLR2有关, 在加入聚合度3~10的果聚糖的同时加入TLR2的阻断抗体, 然后添加10 nmol/L PMA, 发现 β (2 \rightarrow 1) 果聚糖对PMA导致的TER降低的缓解作用有所减弱, 即其保护肠屏障的功能被显著抑制, 显示短链 β (2 \rightarrow 1) 果聚糖是TLR2的配体, 并推测 β (2 \rightarrow 1) 果聚糖与蛋白激酶C (protein kinase C, PKC) 诱导的信号通路有关。随后Wu等^[13]为验证这一猜想, 利用大肠杆菌O157:H7 (肠出血性大肠杆菌 (enterohemorrhage *E. coli*, EHEC)) 引起肠道上皮细胞紧密连接损伤作为肠道屏障破坏模型, 通过Caco-2BBE1细胞和人类肠道组织培养细胞群来测定菊粉和短链低聚果糖 (short-chain fructo-oligosaccharide, scFOS) 对肠道上皮屏障功能的影响。研究表明, 菊粉和scFOS在EHEC肠上皮屏障损伤模型中能通过诱导作用提高封闭蛋白和紧密连接蛋白 (ZO-1蛋白) 的表达水平来维持TER, 减少葡聚糖的漏出, 并且这种诱导作用是通过激活PKC的 δ 亚型相关的信号通路来进行的, 从而改变肠上皮屏障和紧密连接蛋白的功能。从Wu等^[13]的研究还发现一个有趣的现象, EHEC侵染的Caco-2BBE1细胞和肠组织培养细胞群在大分子渗透量和TER的响应上是一致的, 但是在未侵染的细胞中scFOS引起的TER响应和总PKC的磷酸化程度却有较大差异。究其原因, 可能是因为Caco-2BBE1细胞是来源于结肠直肠癌细胞克隆得到的单一类型的细胞, 而肠组织培养细胞群是来源于非癌性的十二指肠活体组织且包含多种不同类型的细胞, 这种相同益生元对癌变细胞系和原代肠道细胞群之间的屏障功能效应差异为我们提出了一个新的启示: 相同益生元在肠道中对不同的细胞可能会引起不同的效应。

另外, 益生元除了通过改变人体肠道菌群组成或肠道上皮细胞应答来间接影响人体的免疫系统外, 也能直接调节免疫反应。一系列研究认为, scFOS等益生元能通过调控单核细胞和肠道上皮细胞中TLR2或Toll样受体4

(Toll-like receptor-4, TLR4) 信号通路的方式来调节白细胞介素 (interleukin, IL) -1、IL-8或CXCL-8、IL-10、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等细胞因子和趋化因子的表达^[14-18]。Johnson-Henry等^[19]发现: 无论Caco2-bbe细胞是否受到EHEC的感染, scFOS均能增加IL-10和转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 的mRNA表达水平, 而菊粉只能增加TGF- β 的mRNA表达水平; 在EHEC感染前用scFOS和菊粉预处理Caco2-bbe细胞, 可观察到TNF- α mRNA表达量的增加和CXCL-8 mRNA表达量的减少。Lehmann等^[15]在有/无乳酸菌存在的情况下培养健康人的单核树突细胞, 用短链低聚半乳糖和长链低聚果糖混合物 (short-chain galacto-oligosaccharide, scGOS/long-chain fructo-oligosaccharide, lcFOS) 进行刺激, 24 h后用酶联免疫吸附法测定细胞因子IL-10和白细胞介素12p70 (interleukin-12p70, IL-12p70) 的分泌情况: 发现在无乳酸菌存在的情况下, scGOS/lcFOS能促进IL-10的释放, 但没有引起IL-12p70的变化; 在乳酸菌存在的情况下, scGOS/lcFOS能更显著地促进IL-10的分泌, 但仍然没有增加IL-12p70的生成; 无论是单独使用低聚糖刺激还是低聚糖和乳酸菌共同刺激, 阻断TLR4时均会消除促进IL-10释放的效应, 这说明scGOS/lcFOS可能通过TLR4而发挥作用。Ortega-González等^[18]用4种益生元 (低聚果糖、菊粉、山羊乳低聚糖、低聚半乳糖) 处理肠道上皮IEC-18细胞和HT-29细胞, 以脂多糖为阳性对照, 检测细胞因子的分泌情况。结果发现, 在IEC-18细胞和HT-29细胞中, 4种益生元均能诱导生长相关癌基因 α 、单核细胞趋化蛋白-1和巨噬细胞炎症蛋白-2等细胞因子的生成。同时加入益生元和Bay11-7082 (一种核因子 κ B- α 磷酸化抑制剂, 能够调控核转录因子 (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号转导途径) 处理时细胞因子的分泌受到抑制; 当敲除TLR信号通路中的一个关键接头分子髓样分化因子 (myeloid differentiation factor88, Myd88) 或TLR4基因后, 细胞的免疫响应极大地降低, 从而推测益生元是肠道上皮细胞中TLR4的配体, 可能通过激活TLR4/NF- κ B信号通路来促进免疫应答。

上述一系列研究表明, 益生元能通过调节参与免疫的细胞数量、比例或免疫相关细胞因子的基因表达水平来调节机体的免疫反应。

2.2 单一组分益生元的功效

目前市售及使用较多的益生元主要为菊粉、低聚果糖、低聚半乳糖, 均是含有不同聚合度寡糖或多糖的混合物, 如菊粉是聚合度为2~60的果聚糖混合物; 蔗果型低聚果糖含有蔗果三、四、五糖及新蔗果三糖和新蔗果四糖等。益生元对人体的有益作用 (如调节肠道菌群, 增强免疫力, 对结肠癌、炎症性肠道疾病和急性感染存

在有益的影响等)已被大量文献和人体实验证实,但大多是采用益生元混合物进行的研究^[20-24]。然而,益生元对人体产生有益作用的具体成分是什么,单一组分通过何种方式或通过何种有益菌株对人体产生何种精准的有益作用,对这方面的认识仍然甚少。

伴随着宏基因组学研究的不断深入,人们对益生菌的认识范围也逐步扩大。人类结肠中存在大约1 000~1 150种细菌(这个数据还在随着技术的不断进步而增加),每个人肠道内大约也有160种以上的细菌。以往人们认识的益生菌主要为双歧杆菌属、乳杆菌属、乳球菌属、链球菌属、肠球菌属等,其中双歧杆菌和乳杆菌是公认安全的益生菌,对机体健康没有致病性。目前人们对肠道益生菌的认识有进一步扩大的趋势,逐渐延伸至普拉梭菌属(*Faecalibacterium prausnitzii*)、普雷沃氏菌属、丁酸弧菌属等。其中的普拉梭菌是新近发现的一类可能的肠道益生菌,也是健康人群肠道中最丰富的微生物之一,约占肠道粪便细菌总数的5%~15%^[25-26],能代谢产生大量的丁酸盐等,具有抗炎效应,可明显改善肠道炎症,同时能通过调节单核细胞和肠道上皮细胞的细胞因子(如IL-8、IL-10等)的表达提高肠黏膜屏障功能^[27-29]。随着对益生菌认识的深入,益生元对人体健康的促进作用也许不仅局限于通过增殖乳杆菌和双歧杆菌等传统意义的益生菌而实现。开展益生元对普拉梭菌、普雷沃氏菌等新型益生菌的增殖效果研究,将进一步明确益生元、益生菌与人体健康的关系。

从世界前沿的研究来看,益生元干预、治疗疾病的研究已开始细化至单一组分益生元的作用研究,逐步建立起“结构-菌群-功能”的对应关系。Shibata等^[30]10多年来研究蔗果三糖(1-kestose, GF₂)对治疗婴幼儿特应性皮炎(atopic dermatitis, AD)的临床影响。由于双歧杆菌在治疗及预防过敏上有潜在的有益影响,在对婴幼儿喂食GF₂的条件下,Shibata等^[30]首先研究了双歧杆菌与婴幼儿AD临床症状改善之间的关系,采用随机、双盲、对照实验研究,选取患有AD的婴幼儿为实验对象,连续12周每人每日口服1~2 g GF₂或麦芽糖,以AD严重程度(scoring atopic dermatitis, SCORAD)评分为AD症状评判标准。结果表明在GF₂组中大便初始双歧杆菌数量小于10⁹ CFU/g的受试者中,双歧杆菌数量显著增加(从10^{8.5} CFU/g增加至10^{9.1} CFU/g);但在整个研究人群(包含GF₂组和安慰剂组)中大便初始双歧杆菌数量大于10⁹ CFU/g的受试者的双歧杆菌数量间没有明显差异,推测定植于婴幼儿肠道微生态系统中的内源性双歧杆菌数的上限值约为10⁹ CFU/g大便。而在实验第0、6、12周时,GF₂组的SCORAD评分分别为41.3、25.3、19.5;安慰剂组的SCORAD评分分别为38.3、36.4、37.5,反映不论初始双歧杆菌数量是否达到上限,服食GF₂使SCORAD

评分得到持续改善。结果表明GF₂具有减轻婴幼儿AD临床症状的作用,然而SCORAD评分与双歧杆菌含量没有明显相关性,暗示摄入GF₂后,除了双歧杆菌外,可能存在另一种机制改善婴幼儿AD患者临床症状。为此,Koga等^[31]开展了GF₂对普拉梭菌及婴幼儿AD随年龄的影响的研究,结果显示普拉梭菌在婴儿出生后在肠道的定植和增殖要比双歧杆菌滞后一些,到2岁左右含量才趋于稳定,为10⁸~10⁹ CUF/g大便,接近成年人水平;2~5岁受试者摄入GF₂后第6周时SCORAD评分改善情况与普拉梭菌含量增加成显著正相关($P=0.044$),而对于0~1岁婴幼儿,GF₂组在实验12周内,普拉梭菌含量均显著增加,但可能由于初始基数小,两者未见显著相关性。为此,作者认为考虑年龄因素的影响,GF₂对较大婴幼儿能有效刺激肠道内普拉梭菌增殖,并可能因此而持续地改善婴幼儿AD症状。另外,Jinno等^[32]研究了GF₂对小鼠乳汁中免疫球蛋白A(immunoglobulin A, IgA)水平的影响,给BALB/c小鼠的饮食中添加质量分数5%的GF₂,发现GF₂的添加显著提高总IgA的含量($P<0.05$),表明GF₂的添加可能会影响肠道和乳腺的免疫系统。

在对益生元组分的深入研究中逐步证实,益生元的种类及糖链的链长对人体健康的有益作用存在差异。刘言佳^[33]研究发现菊粉的聚合度对乳酸杆菌和长双歧杆菌的生长影响很大,随着菊粉的聚合度增加,乳酸杆菌的生长效果逐渐变差;聚合度大于12时,菌株不能生长;聚合度小于4的菊粉对长双歧杆菌的促生长作用优于葡萄糖和果糖;聚合度大于5时,菊粉对长双歧杆菌的促生长作用随聚合度的增加而降低。李琬聪^[34]发现菊粉三糖、四糖对保加利亚乳杆菌、乳双歧杆菌、长双歧杆菌等7种益生菌的增殖作用明显,但随着聚合度的增加,益生菌生长状况有所下降。Vogt等^[12]的研究发现 β (2→1)果聚糖能有效保护T84细胞的屏障,并发现聚合度3~10果聚糖能有效缓解PMA导致的TER值降低,而高聚合度果聚糖则没有显著的缓解作用。

2.3 天然多组分益生元——HMOs

人类母乳中天然存在着一类益生元——HMOs,是继乳糖、脂肪之后的第三大固体组分,在婴幼儿生长发育中起到重要作用。HMOs以乳糖-*N*-四糖,乳糖-*N*-新四糖,乳糖-*N*-六糖为核心结构,可以再度延伸或进行岩藻糖基化和唾液酸化从而形成各种不同的HMOs(例如2'-FL、3-FL、LNT、LNFP I等),总体包含中性低聚糖和酸性低聚糖:中性低聚糖又可分为无岩藻糖基及含岩藻糖基的低聚糖,约占HMOs含量的70%;酸性低聚糖是包含唾液酸及硫酸盐结构的低聚糖,约占HMOs含量的30%^[35-38]。HMOs具有调节肠道菌群、增殖有益菌、抑制有害菌的作用;可作为抗黏附型抗菌剂,以可溶性的诱饵型受体方式防止病原体黏附到婴儿的黏膜表面,降低

感染的风险;能够调节表皮细胞和免疫细胞应答,减少黏膜白细胞的过度浸润和过度激活;并降低坏死性小肠结肠炎发生的风险;同时为婴儿提供唾液酸作为大脑发育和认知力提高的潜在必要营养物质^[39]。

母乳是婴儿最好的营养和食物,是一切婴幼儿配方乳粉研发的金标准,是精准营养最好的标杆。现代科学研究发现,母乳中的各种营养成分,特别是其中的HMOs,伴随母亲泌乳阶段、所处外部环境不同以及种族、血型、基因、年龄、体质差异等,均显示出显著的不同^[40-41]。所以,以HMOs为模板和参照,研究HMOs的组成和变化规律及母婴肠道微生态状况等,分析、统计、总结其内在关联,可以为各种特定益生元的精准复配、协同应用提供科学指导。

2.3.1 中国母亲HMOs成分在泌乳期内的动态变化

目前对HMOs研究所得的一些结果多基于欧美母亲母乳,而对中国母亲HMOs组分的分析和研究很少。可能由于检测手段和受检人群的差异,结果存在较大差距。过往对HMOs的研究分析主要采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)或HPLC-质谱串联法,样品需除去蛋白、脂肪及部分乳糖,再经衍生化后测定。姚文等^[42]用HPLC衍生化法检测了上海51位母亲母乳中9种中性低聚糖的变化趋势,认为其中2'-FL和3-FL的质量浓度在泌乳期呈上升趋势,分别从579.6 mg/L增至787.8 mg/L和84.6 mg/L增至485.8 mg/L, LNFP I的质量浓度则从596.9 mg/L持续下降至304.5 mg/L。而Austin等^[43]用HPLC法检测了北京、广州、苏州共450位母亲母乳中10种低聚糖的变化趋势,却认为包括2'-FL在内的9种低聚糖的含量在初乳或过渡乳时达到最高,保持一定时间后逐渐减少。近年来高效阴离子交换色谱-脉冲电化学检测法迅速发展起来,具有高效、灵敏、准确、线性范围宽、针对性强、无需衍生化处理、操作方便等优点,避免了糖类因初分、衍生化而产生的误差,非常适用于复杂低聚糖混合物的定性和定量分析。魏远安等^[44]建立了一种一次可检测22种HMOs的离子色谱-积分脉冲安培检测法,同时密集收取22位中国江门地区母亲共163份母乳样品,分析其组成和质量浓度变化。该研究结果与Austin等^[43]研究的HMOs变化趋势基本一致,但具体质量浓度有较大差异,特别是2'-FL、3-FL、LNT、LNFP I这4种HMOs,质量浓度范围为15~2 840 mg/L,比Austin等^[43]的15~4 900 mg/L变动范围要小,而3-FL是所有HMOs成分中唯一随泌乳时间延长而保持质量浓度增加的成分。上述一系列结果表明,在整个泌乳期内HMOs的组成及含量是动态变化的。

2.3.2 Lewis血型和相关基因对HMOs组分的影响

目前已确定了超过200种不同的HMOs,但不是每一个妇女合成的HMOs都是一样的^[45]。Lewis血型的不同

能反映HMOs的组分特性,而血型最根本是受基因的调控。决定Lewis血型的2个岩藻糖基转移酶基因FUT2(Se基因或分泌基因)和FUT3(Lewis基因)调控的产物分别是 α -1,2-L-岩藻糖转移酶和 α -1,3/4-L-岩藻糖基转移酶,其在体内表达含量和活性的高低决定了Lewis血型糖链和HMOs糖链中成分结构的差异和特点^[46-50]。在Lewis血型系统中的Le^a抗原是由FUT3基因控制,而Le^b抗原是由FUT3基因和FUT2基因共同控制,根据个体红细胞Le^a抗原和Le^b抗原的检测结果,可分为4种抗原表型:Le(a+b-)、Le(a-b+)、Le(a-b-)和Le(a+b+),这4种表型受Le^a和Le^b抗原分泌状态的影响。FUT3基因表达产物为 α -1,3/4-L-岩藻糖基转移酶,该酶控制产生 α -1,3/4-L-岩藻糖基化的低聚糖;FUT2基因表达产物为 α -1,2-L-岩藻糖基转移酶,该酶控制产生 α -1,2-L-岩藻糖基化的低聚糖。根据FUT2是否正常表达并分泌 α -1,2-L-岩藻糖基转移酶可以将母乳分为分泌型和非分泌型。分泌型母乳中含有丰富的 α -1,2-L-岩藻糖基化低聚糖,而非分泌型母乳中缺乏或只存在很少 α -1,2-L-岩藻糖基化低聚糖。同样根据FUT3是否正常表达并分泌 α -1,3/4-L-岩藻糖基转移酶可以将母乳分为Le阳性型和Le阴性型。通过Lewis血型鉴定和母乳中低聚糖组成分析可研究比对两者的调控关系。

姚文等^[42]分析不同基因型母亲中性寡糖的特异性分类特点,51位母亲的Lewis表型分布情况为:29位母亲属于Le(a-b+),占此人群的56.8%;10位母亲属于Le(a-b-),占19.6%;12位母亲属于Le(a+b-),占23.6%,与在浙江人群中的Lewis基因分型比例相近。在Chaturvedi等^[51]的研究中发现,Le(a-b+)占主导优势的墨西哥人群中,母乳中2'-FL和LNFP I含量最多,居前两位。Musumeci等^[52]研究意大利母亲的初乳,得出73.3%的母亲为Le(a-b+),23.3%为Le(a-b-),而3.3%为Le(a+b-)。魏远安等^[44]对Lewis血型与HMOs成分关系进行了研究,基于Lewis血型类型,在国内首次提出将中国母亲母乳分为分泌型和非分泌型,结果表明分泌型母亲的母乳中富含 α -1,2-L-岩藻糖基化低聚糖(例如2'-FL、LNFP-I、LDFT、LNDHF I)。在分泌型与非分泌型母乳中, α -1,2-L-岩藻糖基化低聚糖的质量浓度范围分别是1 211~7 272 mg/L和100~920 mg/L,然而 α -1,3/4-L-岩藻糖基化低聚糖(例如LNDHF II、DFLNH、3-FL、LNFP II)的质量浓度范围则分别是181~2 722 mg/L和476~4 931 mg/L,分泌型母亲母乳的总HMOs质量浓度比非分泌型母亲高500~1 000 mg/L。

目前可根据FUT2基因和FUT3基因表达情况将个体的乳汁样本分为4种类型,但对于复杂的HMOs仍过于简单化,例如,FUT2和FUT3会竞争某些相同底物等现象^[46,48,53],甚至Se⁻Le⁻的妇女乳汁中虽不能表达FUT2

和FUT3,但乳汁中含有岩藻糖基HMOs,如3-FL或LNFP III。为此,Newburg等^[54]认为可能含有其他独立于FUT2、FUT3基因以外的FUTs(如FUT4、FUT5、FUT6、FUT7或FUT9)。另外, α -1,2-L-岩藻糖基HMOs也被发现存在于非分泌型妇女哺乳期快结束时的乳汁中,且Newburg等^[54]提出FUT1可能参与HMOs的岩藻糖基化。

2.3.3 岩藻糖基化HMOs的地域差异

据Glycom A-S公司2014年申报的FDA GRASS文件GRN000546的附件A中总结的多项研究数据,认为2'-FL在母乳中的平均质量浓度为2 000~4 000 mg/L,但是这一结论主要是根据欧美地区母亲母乳的分析结果得出。魏远安等^[44]对中国母亲母乳的研究表明,2'-FL在中国母亲母乳中的变动范围要小得多:其最低点平均值在非分泌型母亲母乳中,为11 mg/L;最高点平均值在分泌型母亲母乳中,为1 305 mg/L。在过去的报道中,也有2'-FL含量较低的情况出现。Asakuma等^[55]检测日本母亲成熟乳中2'-FL平均质量浓度为1 480 mg/L,Leo等^[56]分析了南太平洋萨摩亚群岛母亲的初乳,其2'-FL的质量浓度为330 mg/L。Erney等^[41]对10个国家母亲的母乳进行研究,发现78%的中国母亲乳汁中含有2'-FL,而菲律宾仅有46%的母亲乳汁中含有2'-FL,可见2'-FL的分泌与地域也存在一定关系,所以是否中国或亚洲地区和欧美地区母乳中2'-FL存在较大差别,甚至其他岩藻糖基化HMOs的含量变化也存在人群差异,值得进一步进行大样本量的比对分析和研究。

3 结 语

伴随着精准营养的发展,益生元以其在健康维护、疾病预防、辅助干预治疗中的独特作用势必受到关注和重视。精准益生元将是基于人群个体遗传背景、生活特征(膳食、运动、生活习惯等)、代谢指征、肠道微生物特征和生理状态(营养水平、疾病状态等)等因素基础上的综合分析精准使用。精准益生元在微生态健康医疗产业的发展离不开对益生元的物理化学性质、成分、结构、生理作用机制的深入研究和深刻理解。对益生元在细胞生物学、分子生物学层面的直接生理功能机制及单一组分益生元功效和天然多组分HMOs等方面的精准化研究,对实现益生元在微生态健康产品、生物医药研发、医疗服务上的精准化定制和科学配方具有重要的社会、商业价值和科学意义,也是益生元今后的重点发展方向。

参考文献:

[1] DA COSTA E, SILVA O, KNÖLL R, et al. Personalized nutrition: an integrative process to success[J]. Genes and Nutrition, 2007, 2(1): 23-25. DOI:10.1007/s12263-007-0019-4.

[2] PHILLIPS R. Nutrition: glycaemic response variation suggests value of personalized diets[J]. Nature Reviews Endocrinology, 2016, 12(1): 6. DOI:10.1038/nrendo.2015.209.

[3] GIBSON G R, ROBERFROID M B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics[J]. Journal of Nutrition, 1995, 125(6): 1401-1412.

[4] GIBSON G R, SCOTT K P, RASTALL R A, et al. Dietary prebiotics: current status and new definition[J]. Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods, 2010, 7(1): 1-19. DOI:10.1616/1476-2137.15880.

[5] BINDELS L B, DELZENNE N M, CANI P D, et al. Towards a more comprehensive concept for prebiotics[J]. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology, 2015, 12(5): 303-310. DOI:10.1038/nrgastro.2015.47.

[6] BROWNAWELL A M, CAERS W, GIBSON G R, et al. Prebiotics and the health benefits of fiber: current regulatory status, future research, and goals[J]. Journal of Nutrition, 2012, 142(5): 962-974. DOI:10.3945/jn.112.158147.

[7] RASTALL R A. Functional oligosaccharides: application and manufacture[J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2010, 1: 305-339. DOI:10.1146/annurev.food.080708.100746.

[8] VOGT L, MEYER D, PULLENS G, et al. Immunological properties of inulin-type fructans[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2015, 55(3): 414-436. DOI:10.1080/10408398.2012.656772.

[9] SLAVIN J. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits[J]. Nutrients, 2013, 5(4): 1417-1435. DOI:10.3390/nu5041417.

[10] QUINTERO M, MALDONADO M, PEREZ-MUNOZ M E, et al. Adherence inhibition of *Cronobacter sakazakii* to intestinal epithelial cells by prebiotic oligosaccharides[J]. Current Microbiology, 2011, 62(5): 1448-1454. DOI:10.1007/s00284-011-9882-8.

[11] SHOAF K, MULVEY G L, ARMSTRONG G D, et al. Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells[J]. Infection and Immunity, 2006, 74(12): 6920-6928. DOI:10.1128/IAI.01030-06.

[12] VOGT L M, MEYER D, PULLENS G, et al. Toll-like receptor 2 activation by β 2 \rightarrow 1-fructans protects barrier function of T84 human intestinal epithelial cells in a chain length-dependent manner[J]. Journal of Nutrition, 2014, 144(7): 1002-1008. DOI:10.3945/jn.114.191643.

[13] WU R Y, ABDULLAH M, MÄÄTTÄNEN P, et al. Protein kinase C δ signaling is required for dietary prebiotic-induced strengthening of intestinal epithelial barrier function[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 40820. DOI:10.1038/srep40820.

[14] VOGT L, RAMASAMY U, MEYER D, et al. Immune modulation by different types of β 2 \rightarrow 1-fructans is toll-like receptor dependent[J]. PLoS ONE, 2013, 8(7): 1-12. DOI:10.1371/journal.pone.0068367.

[15] LEHMANN S, HILLER J, BERGENHENGOUWEN J V, et al. *In vitro* evidence for immune-modulatory properties of non-digestible oligosaccharides: direct effect on human monocyte derived dendritic cells[J]. PLoS ONE, 2015, 10(7): 1-15. DOI:10.1371/journal.pone.0132304.

[16] CAPITÁN-CAÑADAS F, ORTEGA-GONZÁLEZ M, GUADIX E, et al. Prebiotic oligosaccharides directly modulate proinflammatory cytokine production in monocytes via activation of TLR4[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2014, 58(5): 1098-1110. DOI:10.1002/mnfr.201300497.

[17] TSAI C C, LIN C R, TSAI H Y, et al. The immunologically active oligosaccharides isolated from wheatgrass modulate monocytes via

- toll-like receptor-2 signaling[J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(24): 17689-17697. DOI:10.1074/jbc.M112.448381.
- [18] ORTEGA-GONZÁLEZ M, OCÓN B, ROMERO-CALVO I, et al. Nondigestible oligosaccharides exert nonprebiotic effects on intestinal epithelial cells enhancing the immune response via activation of TLR4-NFκB[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2014, 58(2): 384-393. DOI:10.1002/mnfr.201300296.
- [19] JOHNSON-HENRY K C, PINNELL L J, WASKOW A M, et al. Short-chain fructo-oligosaccharide and inulin modulate inflammatory responses and microbial communities in Caco2-bbe cells and in a mouse model of intestinal injury[J]. Journal of Nutrition, 2014, 144(11): 1725-1733. DOI:10.1126/science.162.3858.1142.
- [20] GUIGOZ Y, ROCHAT F, PERRUISSEAU-CARRIER G, et al. Effects of oligosaccharide on the faecal flora and non-specific immune system in elderly people[J]. Nutrition Research, 2002, 22(Suppl 1/2): 13-25. DOI:10.1016/S0271-5317(01)00354-2.
- [21] BOUHNİK Y, ACHOUR L, PAINEAU D, et al. Four-week short chain fructooligosaccharides ingestion leads to increasing fecal bifidobacteria and cholesterol excretion in healthy elderly volunteers[J]. Nutrition Journal, 2007, 6(1): 42-48. DOI:10.1186/1475-2891-6-42.
- [22] SILK D B A, DAVIS A, VULEVIC J, et al. Clinical trial: the effects of a *trans*-galactooligosaccharide prebiotic on faecal microbiota and symptoms in irritable bowel syndrome[J]. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 2009, 29(5): 508-518. DOI:10.1111/j.1365-2036.2008.03911.x.
- [23] 韩桂华, 王春敏, 孙雪丹, 等. 低聚果糖对溃疡性结肠炎模型小鼠肠黏膜屏障影响的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2017, 29(2): 139-141. DOI:10.13381/j.cnki.cjm.201702004.
- [24] 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. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201311063.
- [25] MIQUEL S, MARTÍN R, ROSSI O, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health[J]. Current Opinion in Microbiology, 2013, 16(3): 255-261. DOI:10.1016/j.mib.2013.06.003.
- [26] 黄晓丽, 王国品, 于成功. 普拉梭菌与肠道疾病关系的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2017, 25(9): 810-815. DOI:10.11569/wcjd.v25.i9.810.
- [27] SOKOL H, PIGNEUR B, WATTERLOT L, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients[J]. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2008, 105(43): 16731-16736. DOI:10.1073/pnas.0804812105.
- [28] ROSSI O, VAN BERKEL L A, CHAIN F, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165 has a high capacity to induce IL-10 in human and murine dendritic cells and modulates T cell responses[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 18507. DOI:10.1038/srep18507.
- [29] CARLSSON A H, YAKYMENKO O, OLIVIER I, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* supernatant improves intestinal barrier function in mice DSS colitis[J]. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 2013, 48(10): 1136-1144. DOI:10.3109/00365521.2013.828773.
- [30] SHIBATA R, KIMURA M, TAKAHASHI H, et al. Clinical effects of kestose, a prebiotic oligosaccharide, on the treatment of atopic dermatitis in infants[J]. Clinical & Experimental Allergy, 2009, 39(9): 1397-1403. DOI:10.1111/j.1365-2222.2009.03295.x.
- [31] KOGA Y, TOKUNAGA S, NAGANO J, et al. Age-associated effect of kestose on *Faecalibacterium prausnitzii* and symptoms in the atopic dermatitis infants[J]. Pediatric Research, 2016, 80(6): 844-851. DOI:10.1038/pr.2016.167.
- [32] JINNO S, NAKAMURA Y, NAGATA M, et al. 1-Kestose consumption during pregnancy and lactation increases the levels of IgA in the milk of lactating mice[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2014, 78(5): 861-866. DOI:10.1080/09168451.2014.905179.
- [33] 刘言佳. 不同聚合度菊粉的制备及对乳酸杆菌生长的影响[D]. 大连: 大连工业大学, 2013: 24-45.
- [34] 李琬聪. 菊芋中不同聚合度天然菊糖的分离纯化及生物活性研究[D]. 烟台: 中国科学院烟台海岸带研究所, 2015: 72-75.
- [35] LOCASCIO R G, NINONUEVO M R, KRONEWITTER S R, et al. A versatile and scalable strategy for glycoprofiling bifidobacterial consumption of human milk oligosaccharides[J]. Microbial Biotechnology, 2009, 2(3): 333-342. DOI:10.1111/j.1751-7915.2008.00072.x.
- [36] KUNTZ S, KUNZ C, RUDLOFF S. Oligosaccharides from human milk induce growth arrest via G2/M by influencing growth-related cell cycle genes in intestinal epithelial cells[J]. The British Journal of Nutrition, 2009, 101(9): 1306-1315. DOI:10.1017/S0007114508079622.
- [37] ZIVKOVIC A M, GERMAN J B, LEBRILLA C B, et al. Human milk glycomiome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, 108(Suppl 1): 4653-4658. DOI:10.1073/pnas.1000083107.
- [38] 魏远安, 张丽君, 郑惠玲, 等. 中国母乳低聚糖的研究进展和现状[J]. 乳业科学与技术, 2016, 39(3): 33-38. DOI:10.15922/j.cnki.jdst.2016.03.008.
- [39] BODE L. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama[J]. Glycobiology, 2012, 22(9): 1147-1162. DOI:10.1093/glycob/cws074.
- [40] STAHL B, THURL S, HENKER J, et al. Detection of four human milk groups with respect to Lewis-blood-group-dependent oligosaccharides by serologic and chromatographic analysis[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2001, 501(1): 299-306.
- [41] ERNEY R M, MALONE W T, SKELDING M B, et al. Variability of human milk neutral oligosaccharides in a diverse population[J]. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 2000, 30(2): 181-192. DOI:10.1097/00005176-200002000-00016.
- [42] 姚文, 张卓君, 周婷婷, 等. 中国母亲母乳中中性寡糖的浓度变化[J]. 中国儿童保健杂志, 2009, 17(3): 251-253.
- [43] AUSTIN S, DE CASTRO C A, BÉNET T, et al. Temporal change of the content of 10 oligosaccharides in the milk of Chinese urban mothers[J]. Nutrients, 2016, 8(6): 346-368. DOI:10.3390/nu8060346.
- [44] 魏远安, 郑惠玲, 吴少辉, 等. 中国母乳中低聚糖组分及含量变化: 以中国广东江门地区为例[J]. 食品科学, 2017, 38(18): 180-186. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201718029.
- [45] KOBATA A. Structures and application of oligosaccharides in human milk[J]. Proceedings of the Japan Academy. Series B: Physical and Biological Sciences, 2010, 86(7): 731-747. DOI:10.2183/pjab.86.731.
- [46] KUMAZAKI T, YOSHIDA A. Biochemical evidence that secretor gene, *Se*, is a structural gene encoding a specific fucosyltransferase[J]. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 1984, 81(13): 4193-4197.
- [47] VIVERGE D, GRIMMONPREZ L, CASSANAS G, et al. Discriminant carbohydrate components of human milk according to donor secretor types[J]. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 1990, 11(3): 365-370. DOI:10.1097/00005176-199010000-00014.
- [48] JOHNSON P H, WATKINS W M. Purification of the Lewis blood-group gene associated α -3/4-fucosyltransferase from human milk: an enzyme transferring fucose primarily to type 1 and lactose-based

- oligosaccharide chains[J]. Glycoconjugate Journal, 1992, 9(5): 241-249. DOI:10.1007/BF00731136.
- [49] THURL S, HENKER J, SIEGEL M, et al. Detection of four human milk groups with respect to Lewis blood group dependent oligosaccharides[J]. Glycoconjugate Journal, 1997, 14(7): 795-799. DOI:10.1023/A:1018529703106.
- [50] THURL S, MUNZERT M, HENKER J, et al. Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods[J]. British Journal of Nutrition, 2010, 104(9): 1261-1271. DOI:10.1017/S0007114510002072.
- [51] CHATURVEDI P, WARREN C D, ALTAYE M, et al. Fucosylated human milk oligosaccharides vary between individuals and over the course of lactation[J]. Glycobiology, 2001, 11(5): 365-372. DOI:10.1093/glycob/11.5.365.
- [52] MUSUMECI M, SIMPORE J, AGATA A D, et al. Oligosaccharides in colostrum of Italian and Burkinabe women[J]. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 2006, 43(3): 372-378. DOI:10.1097/01.mpg.0000228125.70971.af.
- [53] XU Z, VO L, MACHER B A. Structure-function analysis of human alpha1,3-fucosyltransferase. amino acids involved in acceptor substrate specificity[J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(15): 8818-8823.
- [54] NEWBURG D S, RUIZ-PALACIOS G M, MORROW A L. Human milk glycans protect infants against enteric pathogens[J]. Annual Review of Nutrition, 2005, 25(25): 37-58. DOI:10.1146/annurev.nutr.25.050304.092553.
- [55] ASAKUMA S, HATAKEYAMA E, URASHIMA T, et al. Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bifidobacteria[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(40): 34583-34592. DOI:10.1074/jbc.M111.248138.
- [56] LEO F, ASAKUMA S, FUKUDA K, et al. Determination of sialyl and neutral oligosaccharide levels in transition and mature milks of Samoan women, using anthranilic derivatization followed by reverse phase high performance liquid chromatography[J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2010, 74(2): 298-303. DOI:10.1271/bbb.90614.