

硫乙醇酸盐优化培养基对嗜黏蛋白阿克曼菌生长及代谢产物的影响

武晓玲¹, 徐琰昭¹, 徐远志¹, 宁可¹, 解庆刚², 许晓曦^{1,*}

(1.东北农业大学食品学院, 乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030;

2.黑龙江飞鹤乳业有限公司, 黑龙江 齐齐哈尔 164800)

摘要: 本研究在硫乙醇酸盐液体培养基的基础上进行调整优化, 嗜黏蛋白阿克曼菌 (*Akkermansia muciniphila*, *Akk*) 培养最终活菌数可达到 10^9 CFU/mL以上。同时, 利用非靶向代谢组学技术对比分析两种培养基发酵上清液中的差异代谢物并对其中特征性产物进行了生理功能分析。结果表明, *Akk*利用优化后的培养基通过影响蛋白质的消化和吸收、氨酰基tRNA生物合成、胆汁分泌、ABC转运蛋白、氨基酸生物合成等代谢通路, 产生更多的丙酸、巴多昔芬、多烯紫杉醇、长春花碱等多种功能性代谢产物, 与抗癌、抗炎、减肥等功能直接相关。这一研究为*Akk*作为益生菌制剂及后生元对诸多疾病的调控功能性提供了确凿证据, 同时为今后的工业化生产奠定了理论基础。

关键词: 嗜黏蛋白阿克曼菌; 培养基优化; 差异代谢物; 代谢通路; 后生元

Effect of Optimized Thioglycolate Medium on the Growth and Metabolites of *Akkermansia muciniphila*

WU Xiaoling¹, XU Jinzhao¹, XU Yuanzhi¹, NING Ke¹, XIE Qinggang², XU Xiaoxi^{1,*}

(1. Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Heilongjiang Feihe Dairy Co. Ltd., Qiqihar 164800, China)

Abstract: In this study, *Akkermansia muciniphila* (*Akk*) was cultured to a concentration of more than 10^9 CFU/mL in optimized liquid thioglycolate medium. Besides, the differential metabolites in the fermentation supernatants from the original and optimized medium were analyzed by non-targeted metabolomics, and the physiological functions of the characteristic products were evaluated. The results showed that when cultured in the optimized medium, *Akk* produced higher amounts of various functional metabolites such as propionic acid, bardoxifene, docetaxel and vinblastine by affecting protein digestion and absorption, aminoacyl tRNA biosynthesis, bile secretion, ATP-binding cassette (ABC) transporter, and the metabolic pathways of amino acid biosynthesis. These metabolites could be directly related to anti-cancer, anti-inflammatory, anti-obese and other functions. This study provides solid evidence that *Akk* can function as a probiotic agent and postbiotic to regulate many diseases, and lays a theoretical foundation for future industrial production.

Keywords: *Akkermansia muciniphila*; medium optimization; differential metabolites; metabolic pathways; postbiotic

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221109-098

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2023) 18-0183-10

引文格式:

武晓玲, 徐琰昭, 徐远志, 等. 硫乙醇酸盐优化培养基对嗜黏蛋白阿克曼菌生长及代谢产物的影响[J]. 食品科学, 2023, 44(18): 183-192. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221109-098. <http://www.spkx.net.cn>

WU Xiaoling, XU Jinzhao, XU Yuanzhi, et al. Effect of optimized thioglycolate medium on the growth and metabolites of *Akkermansia muciniphila*[J]. Food Science, 2023, 44(18): 183-192. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221109-098. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2022-11-09

基金项目: 黑龙江省“百千万”工程科技重大专项课题(2020ZX07B01-2-5)

第一作者简介: 武晓玲(1998—)(ORCID: 0000-0001-5280-4658), 女, 硕士研究生, 研究方向为乳品分子营养学、益生菌与肠道健康。E-mail: wuxiaoling0414@163.com

*通信作者简介: 许晓曦(1968—)(ORCID: 0000-0002-4350-0094), 女, 教授, 博士, 研究方向为乳品分子营养学、乳品科学与工程。E-mail: xiaoxi_xu01@163.com

嗜黏蛋白阿克曼菌 (*Akkermansia muciniphila*, *Akk*) 被称作新一代益生菌, 是一种典型的哺乳动物肠道菌, 依赖于肠道上皮细胞分泌的黏蛋白生存^[1], 是肠道黏液层的关键微生物^[2], 更与多种疾病存在重要关联^[3]。肠道内 *Akk* 降解黏蛋白的代谢产物, 如短链脂肪酸等, 可调节脂质代谢和免疫应答相关基因的表达^[4], 减轻肝脏氧化应激和炎症、减轻乙酰氨基酚诱导的肝损伤^[5]。Mithieux 等^[6]还发现, *Akk* 能促进肠道黏液产生, 使黏液层增厚, 并通过促进 Foxp3 + Treg、白细胞介素 IL-10、转化生长因子 TGF- β 表达, 减少胰岛炎症, 在 I 型糖尿病中起保护作用。口服 *Akk* 菌及其外膜蛋白 Amuc_1100 可增加结肠和肠系膜淋巴结中细胞毒性 T 淋巴细胞 CTL 的数量, 上调其肿瘤坏死因子 TNF- α 表达、抑制程序性死亡受体 PD-1 表达, 对小鼠结肠炎相关的结直肠癌起抑制作用^[7]。口服 *Akk* 还可改善老化小鼠的肠道表型, 增强肠屏障完整性和肠细胞增殖再生能力, 改善认知功能、减少虚弱和肌肉萎缩, 维持健康及延长寿命^[8], 因此该菌也被称为“长寿菌”。除此之外, 尚有报道称 *Akk* 在肠黏膜炎^[9]、非酒精性脂肪肝^[10]、结肠炎^[11]等疾病的治疗中也发挥重要作用。目前全球唯一一家 *Akk* 活菌制剂生产企业——美国 Pendulum 公司于 2020 年 6 月 4 日已上市销售, 其作为特医产品主要用于 II 型糖尿病的治疗^[6]。

Akk 作为一种典型的肠道菌, 只能耐受低浓度的氧气, 其体外培养更是生长周期长、生长速度慢。本团队前期研究发现, 该菌生长存在一定的自然周期性, 给工业化高密度培养带来更多难题。到目前为止, Derrine 等^[12]提出适用于 *Akk* 培养的黏蛋白培养基是目前唯一的选择性培养基, 但近年来研究也发现, *Akk* 可在其他培养基中增殖, 如脑心浸液肉汤 (brain-heart infusion broth, BHI) 培养基^[13]等。Liu Xinyue 等^[14]则以黏蛋白培养基为对照, 将不同含量的黏蛋白加入 BHI 培养基中培养, 以满足 *Akk* 的营养需求; Machado^[15]、Almeidado^[16]等用 PYG 肉汤培养基评估了 *Akk* 在不同温度、大气和胃肠道模拟条件下的培养情况, 活菌数可达到 1.3×10^9 CFU/mL, 但由于这些培养基成分均较为复杂导致其成本较高, 增加了工业化生产的难度。

本团队研究发现, *Akk* 可利用硫乙醇酸盐液体培养基, 且该培养基成分简单价格便宜, 唯其生长速度较为缓慢。在该培养基的基础上筛选确定以卵清蛋白代替原培养基中的酵母浸粉, 调整培养基中氮源的配比, 以磷酸二氢钾替换氯化钠, 并调整各组分的添加量, 筛选出适合工业化生产且价格更低的优化培养基配方。因不同的营养条件可影响菌的代谢产物种类及组成, 且目前对 *Akk* 代谢产物与宿主疾病间互作关系鲜有报道, 目前仅有 Martin-Gallausiaux 等^[17]发现 *Akk* 菌培养上清液能够激活肠上皮细胞中的 NF- κ B 信号通路, 上调 *MUC 2*、*BIRC 3*

和 *TNFAIP 3* 等肠屏障功能相关基因的表达, 提高肠细胞单层的完整性。因此利用非靶向代谢组学技术对比分析 *Akk* 在这两种培养基中代谢产物的差异, 结合京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路探究其特征性代谢产物与疾病的关联, 并以此证明优化培养基在工业化高密度培养中的优势及应用前景, 旨在为 *Akk* 在中国的工业化生产提供科学基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Akk DSM 22959 北京北纳创联生物技术研究院; 硫乙醇酸盐液体培养基 青岛高科园海博生物技术有限公司; 无水葡萄糖 天津市凯通化学试剂有限公司; 卵清蛋白 (80%~90%) 大连美仑生物技术有限公司; 酪蛋白胨 上海麦克林生化科技有限公司; 硫代乙醇酸钠 中国惠兴生化试剂有限公司; *L*-胱氨酸 上海瑞永生物科技有限公司; 刃天青 北京博奥拓科技有限公司; 磷酸二氢钾 (分析纯) 天津致远化学试剂有限公司; 氢氧化钠 天津市大陆化学试剂厂; 1499230-935 乙腈 (分析纯)、70221 乙酸铵 ($\geq 98\%$) 德国默克公司。

1.2 仪器与设备

GI 54 DWS 高压灭菌器 美国致微仪器有限公司; OptiClean 1300 洁净工作台 上海力康精密科技有限公司; LC-85 C 隔膜式抽气泵 上海力辰邦西仪器科技有限公司; TS 2210 K 12 GB 5099 氮气钢瓶 哈尔滨市通达工业气体有限公司; SPL-80 生化培养箱 天津莱玻特瑞仪器设备有限公司; UV 752 N 紫外分光光度仪 上海仪电分析仪器有限公司; 5430 R 低温高速离心机 德国艾本德公司; AB Triple TOF 6600 质谱仪 美国爱博才思公司; 1290 Infinity LC 超高压液相色谱仪 美国安捷伦科技公司。

1.3 方法

1.3.1 菌种活化与传代

将安瓿管中的 200 μ g *Akk* 冻干菌粉接入 10 mL 硫乙醇酸盐液体培养基中, 在 37 $^{\circ}$ C 条件下厌氧 (101 kPa、90% N_2 、10% CO_2) 培养 5 d, 菌种恢复活力后, 以 4%^[18] (体积分数) 接种量接种至硫乙醇酸盐液体培养基中传代, 在上述条件下培养, 每隔 24 h 进行传代, 实验使用第 3 代菌。所有操作均在无菌条件下进行。

1.3.2 *Akk* 在两种培养基中生长曲线的测定

将活化后第 3 代 *Akk* 按照 4% 接种量分别接种至硫乙醇酸盐液体培养基和优化培养基中, 在 1.3.1 节条件下培养。测定菌液密度, 每隔 4 h 测定一次菌液的 OD_{600 nm}, 以

培养时间为横坐标、吸光度为纵坐标绘制生长曲线,每次测定均设置3个重复。

1.3.3 活菌计数

采用平板倾注的方法进行平板计数。用生理盐水将 *Akk* 在两种培养基中生长到稳定期的菌液进行梯度稀释,实验选用 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 3个梯度,分别吸取200 μL 稀释后的菌液到灭菌培养皿中,配好的琼脂培养基冷却到45 $^{\circ}\text{C}$ 左右,倾注到培养皿中,并立即轻轻水平转动培养皿,使菌液于培养基充分混匀,待培养基凝固后将平板倒置,在1.3.1节条件下培养,4 d后选取菌落数在30~300个之间的平板统计菌落数,按下式计算活菌数:

$$\text{活菌数}(\text{CFU}/\text{mL}) = \text{同一稀释度平板上菌落平均数} \times \text{稀释倍数} \times 5$$

1.3.4 *Akk*发酵上清液的制备

将*Akk*分别接种到硫乙醇酸盐液体培养基和优化培养基中,在1.3.1节条件下培养至稳定期,1 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心10 min,并用0.22 μm 滤膜过滤,得到发酵上清液,于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存备用,每个样本设置6次重复。

1.3.5 *Akk*发酵液样本提取

样本在4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下缓慢解冻后,取适量样本加入预冷甲醇-乙腈-水(2:2:1, *V/V/V*),涡旋混合,低温超声30 min, -20 $^{\circ}\text{C}$ 静置10 min,14 000 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心20 min,取上清液真空干燥,质谱分析时加入100 μL 乙腈溶液(乙腈:水=1:1, *V/V*)复溶,涡旋,14 000 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心15 min,取上清液进样分析。

1.3.6 液相色谱-质谱分析

1.3.6.1 色谱条件

样本采用Agilent 1290 Infinity LC超高效液相色谱系统HILIC色谱柱进行分离;柱温25 $^{\circ}\text{C}$,流速0.5 mL/min,进样量2 μL ;流动相A为水+25 mmol/L乙酸铵+25 mmol/L氨水,B为乙腈。梯度洗脱程序如下:0~0.5 min,5% A、95% B;0.5~7 min,5%~35% A、95%~65% B;7~8 min,35%~60% A、65%~40% B;8~9 min,60% A、40% B;9~9.1 min,60%~5% A、40%~95% B;9.1~12 min,5% A、95% B;整个分析过程中样品置于4 $^{\circ}\text{C}$ 自动进样器中。为避免仪器检测信号波动而造成的影响,采用随机顺序进行样本的连续分析。样本队列中插入质控(quality control, QC)样品,用于监测和评价系统的稳定性及实验数据的可靠性(QC样本是由待测样本等量混合制成,在待测样本液相色谱-串联质谱进样前、进样中和进样后上机检测)。

1.3.6.2 质谱条件

采用AB Triple TOF 6600质谱仪进行样本一级、二级谱图的采集。色谱分离后的电喷雾电离源条件如下:雾化气压(Gas1)60 kV,辅助气压(Gas2)60 kV,帘气压力30 arb,发射源温度600 $^{\circ}\text{C}$,喷雾电压 $\pm 5\ 500\ \text{V}$ (正负两种模式);飞行时间质谱扫描范围 m/z 60~1 000,

产物离子扫描范围 m/z 25~1 000,飞行时间质谱扫描累积时间0.20 s/spectra,产物离子扫描累积时间0.05 s/spectra;二级质谱采用数据相关采集获得,并且采用高灵敏度模式,去簇电压设为 $\pm 60\ \text{V}$ (正负两种模式),碰撞电压设为(35 \pm 15) eV。

1.4 数据处理与分析

每次实验均设置3次重复,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用IBM SPSS Statistics 25软件进行显著性方差分析, $P < 0.05$,差异显著,用Origin 2018 64 bit软件绘制生长曲线。原始数据经预处理后进行代谢物结构鉴定、单变量统计分析、结合主成分分析(principal component analysis, PCA)法及正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)法进行多维统计分析,利用中科新生命生信云平台筛选差异显著代谢物并进行生物信息学分析。

2 结果与分析

2.1 *Akk*在两种培养基中的生长情况对比

由于*Akk*在硫乙醇酸盐液体培养基中生长其菌液密度极低(生长速度慢且活菌数较少),因此本课题组前期在硫乙醇酸盐液体培养基的基础上,对*Akk*培养基进行优化。为确定*Akk*在两种培养基中的生长稳定期以制备发酵上清液样本,并对比*Akk*在两种培养基中的生长情况,通过测定菌液 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 并绘制生长曲线,结果如图1所示。

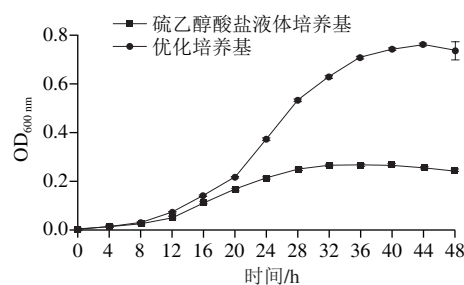


图1 *Akk*在两种培养基中的生长曲线
Fig. 1 Growth curves of *Akk* in original and optimized thioglycolate medium

由图1可知,0~8 h为*Akk*的生长迟缓期,12 h左右进入生长对数期。在硫乙醇酸盐液体培养基中,*Akk*生长对数期为12~32 h,32 h菌液 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 达到最高(0.269 \pm 0.003),之后进入稳定期,稳定期活菌数为 6.75×10^7 CFU/mL。而在优化培养基中的生长对数期同样在12 h左右进入对数期,44 h时菌液 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 最高可达0.761 \pm 0.011,是硫乙醇酸盐液体培养基的2.83倍,并在44 h之后趋于稳定,稳定期的活菌数为 1.74×10^9 CFU/mL,比硫乙醇酸盐液体培养基高出2个数量级。由此可知,优化后的培养基虽相对延长了*Akk*的对数生长期,但显著提

高了 *Akk* 的菌液密度及活菌数。并由此选择其在硫乙醇酸盐液体培养基和优化培养基中进入生长旺盛期的 32 h 和 44 h 发酵上清液，用以分析两组样本的差异代谢物。

2.2 差异性代谢组学分析结果

2.2.1 QC分析

为评价仪器的稳定性及数据质量的可靠性，分别在正负离子模式下将QC样本总离子流图进行谱图重叠比较，结果如图2所示。结果表明两种模式下各色谱峰的响应强度和保留时间均基本重叠，说明在整个实验过程中仪器误差引起的变异较小，实验结果较为可靠。

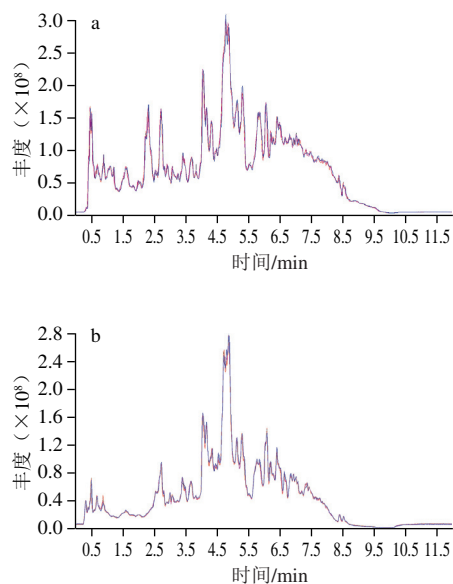


图2 正(a)、负(b)离子模式QC样本总离子流图重叠谱图

Fig. 2 Total ion current chromatograms of QC samples in positive (a) and negative (b) ion modes

2.2.2 代谢物鉴定数量及化学分类归属统计

通过高效液相色谱-串联飞行时间质谱联用仪检测 *Akk* 在两种培养基发酵上清液中的代谢产物，正负离子模式下合计鉴定到代谢产物 2 253 种，其中正离子模式下鉴定到代谢产物 1 585 种，负离子模式下鉴定到 668 种。根据化学分类归属信息将所有代谢物进行分类统计，各类代谢物数量所占比例如图3所示。

两组样本中检测到的代谢物包括有机酸及其衍生物 (34.976%)，脂质和脂质类分子 (21.127%)，有机杂环化合物 (10.567%)，苯甲酸类 (6.569%)，有机氧化合物 (5.237%)，苯丙烷和聚酮 (4.172%)，核苷、核苷酸和类似物 (2.308%)，有机氮化合物 (1.243%)，生物碱及其衍生物 (0.666%)，木质素、新木质素及相关化合物 (0.178%)，有机金属化合物 (0.133%)，有机硫化物 (0.133%)，烃类衍生物 (0.089%) 和未命名化合物 (12.605%) 等。

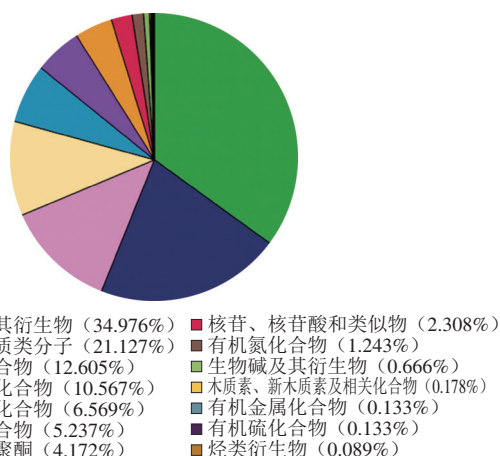


图3 鉴定的代谢物在各化学分类的数量占比

Fig. 3 Proportion of metabolites identified in various chemical classifications

2.2.3 组间差异分析

本研究结合单变量统计分析和多维统计分析方法，筛选 *Akk* 在两种培养基中的显著性差异代谢物，对正、负离子模式下检测到的显著性差异代谢物进行分析。

2.2.3.1 单变量统计分析

在进行两组样本间的差异分析时，常用的单变量统计分析方法包括差异倍数 (fold change, FC) 分析、*T* 检验/非参检验。基于单变量分析，对正、负离子模式下检测到的所有代谢物 (含未被鉴定的代谢物) 进行差异分析，筛选出 $FC > 1.5$ 或 $FC < 0.67$ ， $P < 0.05$ 的差异代谢物共 902 种，其中正离子模式下 670 种，负离子模式下 232 种。将这些差异代谢物用火山图的形式表示，结果如图4所示。

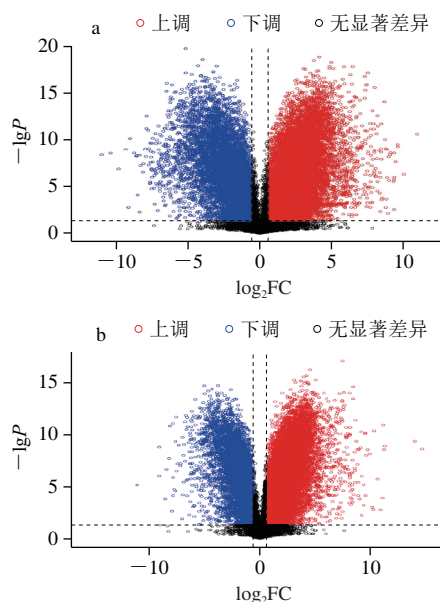


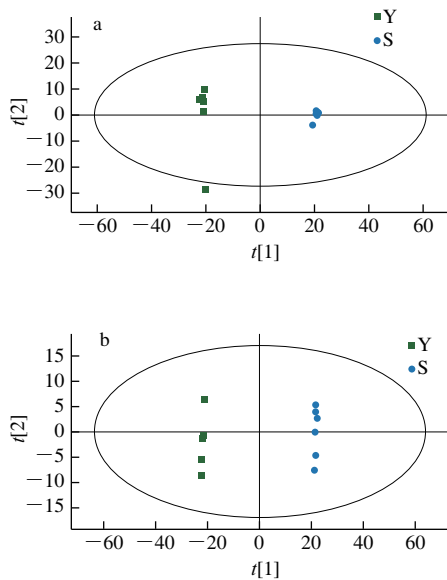
图4 正(a)、负(b)正负离子模式火山图

Fig. 4 Volcano maps of differential metabolites in positive (a) and negative (b) ion modes

如图4所示, 每个圆圈代表一个特定的代谢产物, 优化后相对优化前, 红色为显著上调的代谢产物 ($FC > 1.5, P < 0.05$), 蓝色为显著下调的代谢产物 ($FC < 0.67, P < 0.05$), 圆圈越靠近左右两边和上边, 差异性越显著, 黑色为非显著性差异代谢物。之后研究均针对红色和蓝色圆圈代表的显著性差异代谢物。

2.2.3.2 多维统计分析

多维统计分析可以从总体水平反映组间差异以及组内的变异度, 常采用的方法包括PCA和OPLS-DA。将鉴定到的所有代谢物重新线性组合得到PCA模型, 采用PCA方法, 能从总体上反映样本的总体分布趋势和组件样本的差异度。两组样本的PCA得分图如图5所示。



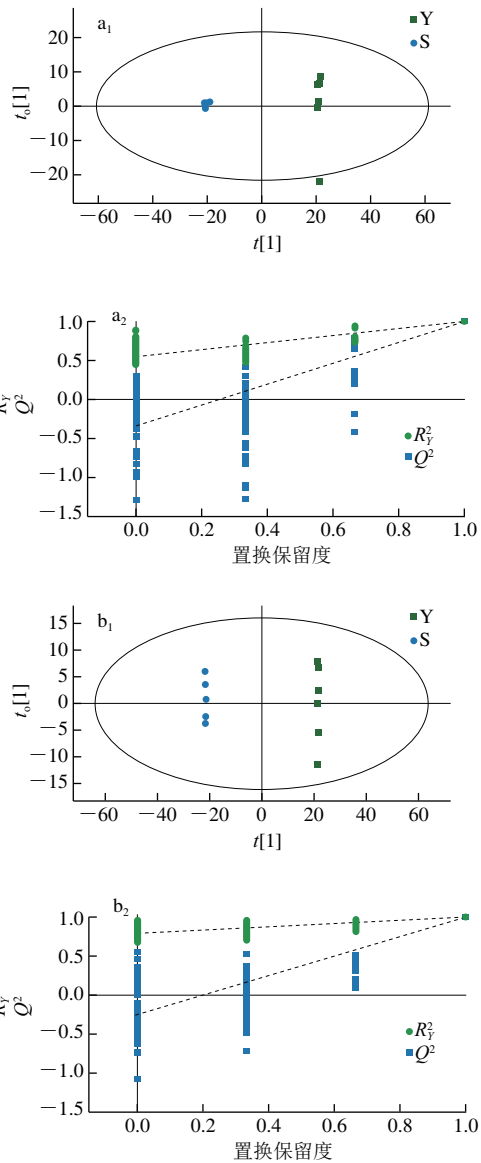
Y.优化培养基上清液样本; S.硫乙醇酸盐液体培养基上清液样本。下同。

图5 正(a)、负(b)离子模式下PCA得分图

Fig. 5 PCA score plots in positive (a) and negative (b) ion modes

图5中椭圆代表95%置信区间, 同一颜色的点表示组内的各个生物学重复, 由点的分布状态可以看出, 该模型可以区分两组样本, 组间样本的数据点很好地集中在一起。PCA模型参数 R^2_Y 越接近1表明模型越可靠, 正、负离子模式下的模型解释率 R^2_Y 分别为0.835和0.855。结果表明该模型稳定可靠, 实验重复性好, 随机误差较小, 可进一步对样本进行差异性分析。

OPLS-DA是为了滤除与分类信息无关的噪音、提高模型的解析能力和有效性。为避免模型在建模过程中发生过拟合, 保证模型的有效性, 采用置换检验对模型进行检验。OPLS-DA得分图及OPLS-DA置换检验如图6所示。



1. OPLS-DA得分图; 2.置换检验图。

图6 正(a)、负(b)离子模式下OPLS-DA得分图及置换检验图

Fig. 6 OPLS-DA score plots and permutation test plots in positive (a) and negative (b) ion modes

如图6所示, $t[1]$ 能最大程度反映组间差异, 而 $t_0[1]$ 则反映组内变异。可以看出OPLS-DA模型可显著区分两组样本, 且组内差异较小, 结果与PCA模型一致。经7次循环交叉验证得到模型评价参数 R^2_Y 、 Q^2 , 通常情况下 $Q^2 > 0.5$ 即表明模型稳定可靠。该模型正、负离子模式下的 Q^2 分别为0.998、0.999, 均大于0.5。在置换检验中, 随着置换保留度逐渐下降, 随机模型的 R^2 和 Q^2 均逐渐下降, 说明原模型不存在过拟合现象, 模型稳定性良好。

2.2.3.3 筛选差异代谢物

OPLS-DA模型得到的变量权重值(variable importance for the projection, VIP)表示变量投影重要

度, 值越大, 表示越重要。本实验以VIP>1和 $P<0.05$ 为显著性差异代谢物的筛选标准, 正离子模式下筛选到670种显著性差异代谢物, 负离子模式下筛选到232种显著性差异代谢物, 由于筛选到的差异代谢物过多, 且表格无法直观地显示这些代谢物的FC, 因此, 选择VIP值前50的差异代谢物, 以柱状图形式展示鉴定到的显著性差异代谢物的FC变化, 结果如图7所示。可以看出, 与硫乙醇酸盐液体培养基相比, *Akk*在优化培养基中发酵后, 正离子模式下22种代谢产物显著上调, 28种代谢产物显著下调, 负离子模式下显著上调代谢产物22种, 显著下调代谢产物28种。后续将对这些显著性差异代谢物进行分析。

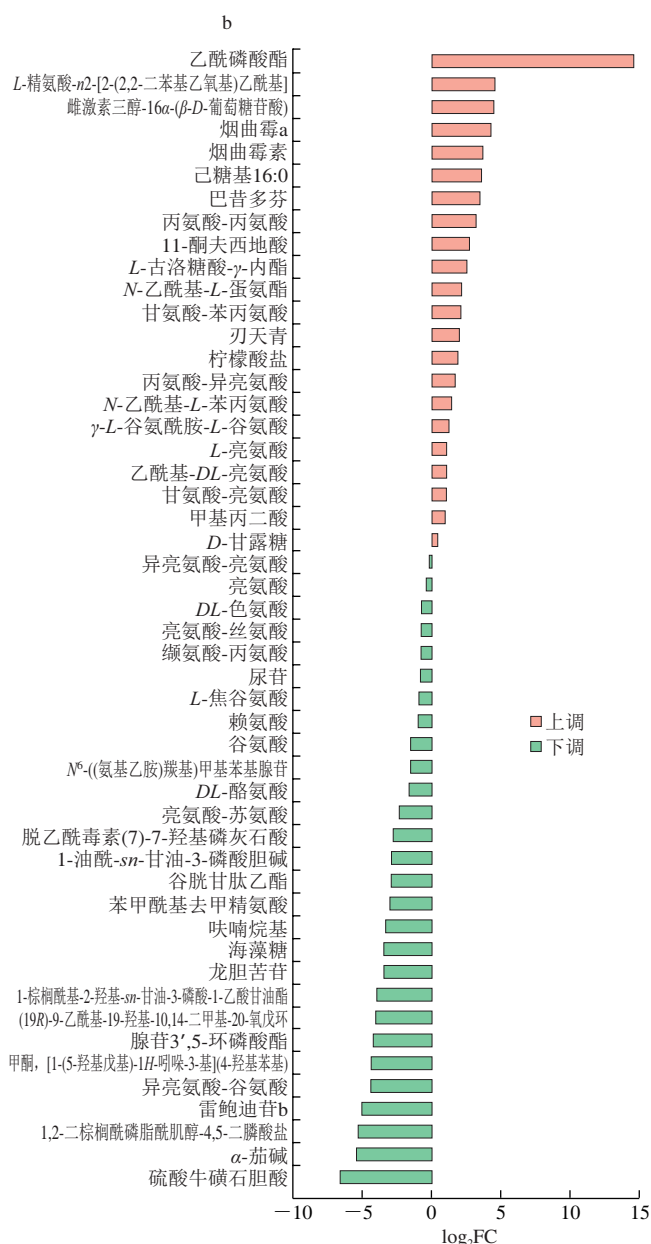
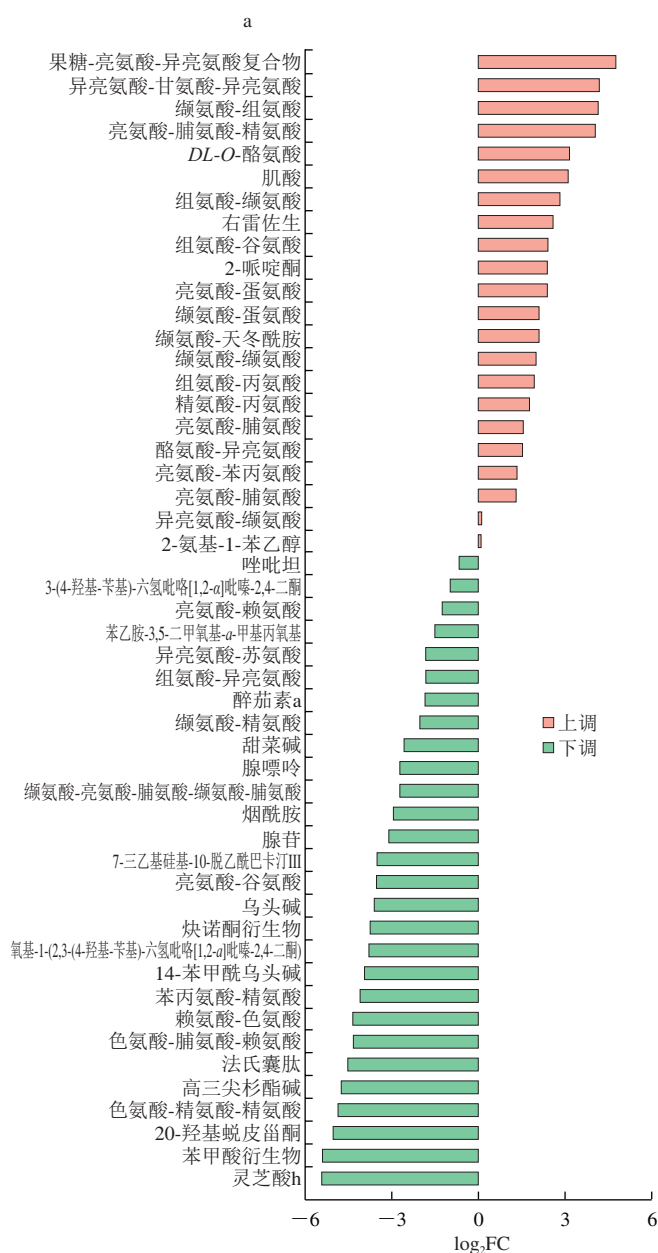


图7 正(a)、负(b)离子模式显著性差异代谢物表达FC分析(VIP前50)

Fig. 7 Fold change (FC) of significantly differential metabolites with top 50 highest VIP scores in positive (a) and negative (b) ion modes

2.2.4 聚类分析

为了更全面直观地显示样本之间的关系以及代谢物在不同样本中的表达模式差异, 将VIP值前50的显著性差异代谢物用层次聚类进行聚类分析, 结果如图8所示。聚在同一簇内的代谢物具有相似的表达模式, 可能具有相似的功能或者共同参与同一代谢过程或者细胞通路。

*Akk*发酵优化培养基产生的代谢产物中, 显著上调的代谢产物有肌酸、2-哌啶酮、2-氨基-1-苯乙醇、乙醚磷酸酯、烟曲霉素、巴多昔芬、N-乙酰-L-蛋氨酸、柠檬酸盐、甘露糖和各种多肽等, 这些代谢产物在人体疾病的调控中发挥着重要作用。其中肌酸^[19]被认为有抗炎作用, 可减少炎症标志物的出现, 并可抑制免疫反应, 并

在钙稳态中发挥作用,可减少氧化应激,且有可能在水肿、神经炎症和神经传递改变方面发挥作用;烟曲霉素^[20]是一种具有多种生物活性的抗生素,与降低体质量、有效抑制肝肿瘤的生长和转移功能相关,Takayuki等^[21]还发现,烟曲霉素是一种有效的血管生成抑制剂,能通过激活内皮细胞中的p53通路上调p21表达,抑制血管生成并抑制肿瘤细胞生长。巴多昔芬^[22]是一种雌激素受体调节剂,已被美国食品和药物管理局批准上市,用于预防绝经后女性骨质疏松。近年来大量研究证明了巴多昔芬在疾病中的作用,如抑制雌激素受体Cyclin D 1、p-P 70 S 6 K、Survivin、c-Myc和Bcl-2的表达抑制雌激素受体阳性乳腺癌细胞^[23];通过抑制IL-6/IL-6R/STAT3信号传导发挥抗炎和抗动脉粥样硬化作用,并能够在肿瘤细胞中抑制白细胞介素IL-6与gp 130蛋白结合并阻断其下游信号通路传导^[24];可有效穿过血脑屏障,缓解卵巢切除诱导的小鼠空间记忆损伤等^[25]。由此表明, *Akk*的这些代谢产物是该菌在缓解肠道炎症,治疗癌症、神经系统等疾病主要功能因素。

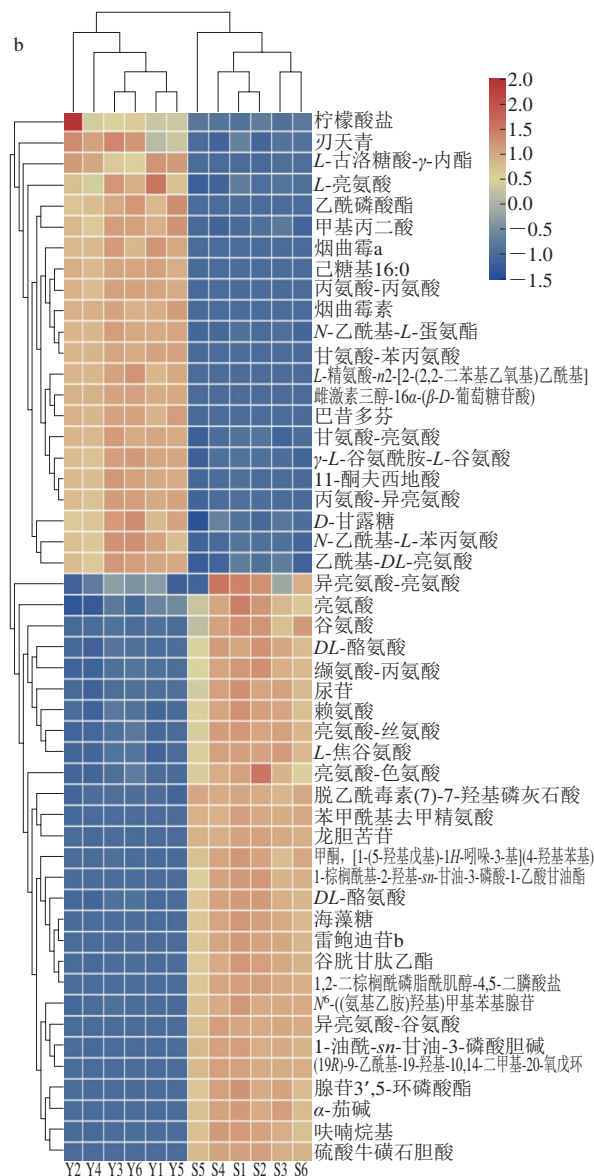
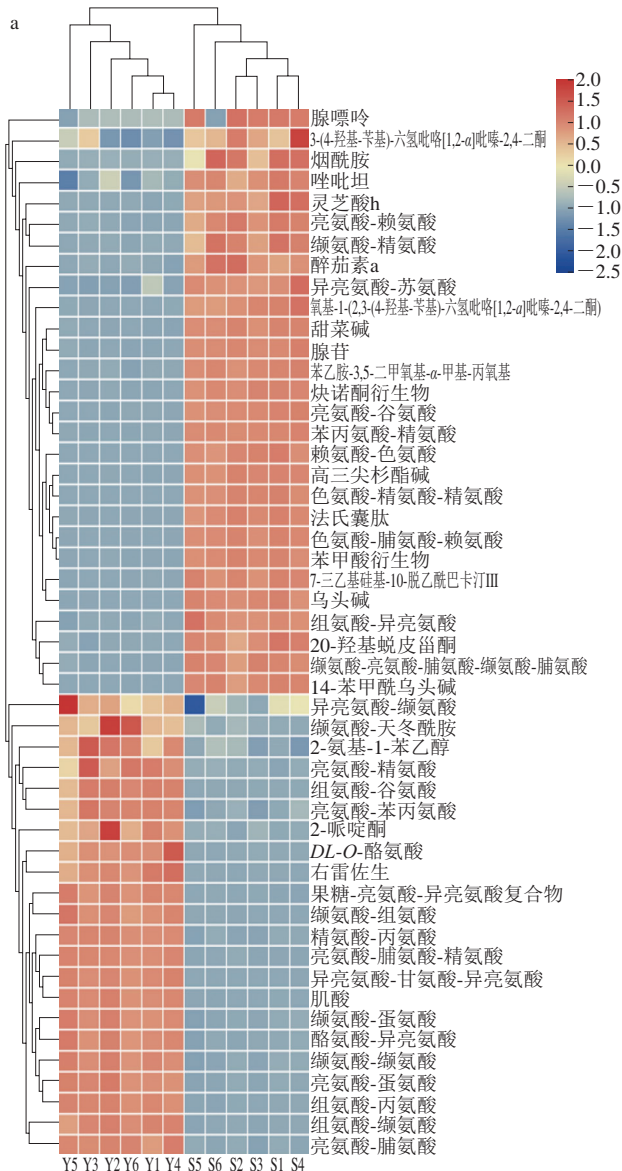


图8 正(a)、负(b)离子模式显著性差异代谢物层次聚类热图
Fig.8 Hierarchical clustering heatmaps of significantly differential metabolites in positive (a) and negative (b) ion patterns

显著下调的产物有:乌头碱、苯甲酰乌头原碱、烟酰胺、高三尖杉酯碱、灵芝酸、尿苷、焦谷氨酸、海藻糖、龙胆苦苷等。其中,乌头碱是有毒植物中存在的一种毒性成分二萜类生物碱,毒性极强,具有心脏毒性、神经毒性、生殖毒性、胚胎毒性,同时能通过血液吸收危害肝脏、肾脏等靶器官^[26]。实验结果发现优化培养基中的乌头碱显著下调,说明*Akk*在优化培养基中发酵能更大程度发挥预防及治疗心血管疾病、神经系统疾病、肝脏疾病的作用^[27]。除此之外的*Akk*代谢产物均被发现有一定抗炎、抗肿瘤、抗肥胖等益生功效,但是优化培养基中这些产物均有不同程度的下调,因此表明,补充*Akk*活菌制剂时应注意其有效菌数,过多的活菌数可能带来疾病风险,Wang Qi等^[28]研究发现,硫酸软骨

素 (chondroitin sulfate, CS) 缓解还是恶化骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 与肠道菌群的结构有关, 在 *Akk* 丰度适中时, CS 能够改善 OA, 但 *Akk* 含量高于或者低于硫酸酯酶分泌菌和硫酸盐还原菌时, CS 均能加重 OA。也有研究^[29]提出, 补充灭活 *Akk* 可显著改善超重/肥胖的胰岛素抵抗者的多项代谢指标, 且安全性良好, 效果优于 *Akk* 活菌, 由此为其作为后生元提供了有效证据。

2.2.5 KEGG通路注释与分析

在生物体内不同代谢物需要相互协调行使其生物学功能, 基于KEGG通路分析有助于更进一步了解其生物学功能。为了解 *Akk* 在不同培养基中代谢产物含量变化的机制, 将正负离子模式下检测到的显著性差异代谢物整合后进行KEGG通路注释, 并根据 *P* 值选择显著性最高的前20条KEGG通路进行富集, 富集结果以气泡图的形式显示, 结果如图9所示。

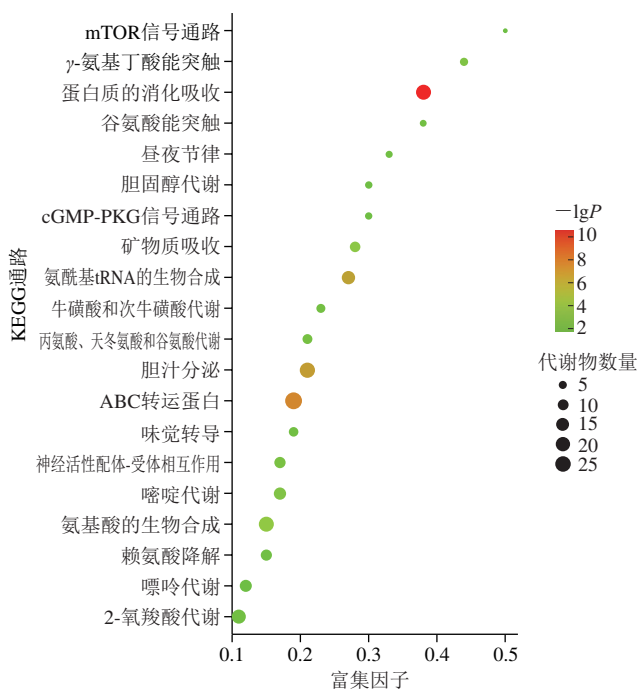


图9 KEGG富集通路气泡图

Fig. 9 Bubble diagram of KEGG enrichment pathway

富集最显著的5个通路为蛋白质的消化和吸收、氨酰基tRNA生物合成、胆汁分泌、ABC转运蛋白、氨基酸生物合成。其中, 蛋白质的消化和吸收通路富集最为显著, 强调蛋白质是 *Akk* 的第一营养需求, 因此培养基优化主要针对这一需求进行。在这些通路中, 蛋白质的消化和吸收、胆汁的分泌是 *Akk* 消化系统中的代谢通路, 氨酰基tRNA生物合成在 *Akk* 的遗传信息处理中发挥重要作用, ABC转运蛋白涉及到 *Akk* 的膜运输功能, 对外界环境的信息进行处理, 氨基酸生物合成则可合成多种氨基酸, 人体所需的多种必需氨基酸包含其中, 这

些氨基酸均由培养基中的氮源即卵清蛋白和酪蛋白胨代谢得到。富集到胆汁分泌通路上的代谢物有20种, 这些代谢物包括茛地那韦、依托泊苷、普伐他汀、多西紫杉醇、阿昔洛韦、乌本苷、长春花碱等, 其中茛地那韦^[30]是一种选择性、强效和特异性的HIV蛋白酶抑制剂, 目前用于治疗获得性免疫缺陷综合征, 还能显著减轻链脲佐菌素诱导的阿尔兹海默症 (Alzheimer's disease, AD) 相关的记忆缺陷^[31], 而相关研究表明, AD大鼠模型中, *Akk* 可减轻AD大鼠的认知障碍^[32]。依托泊苷^[33]、多烯紫杉醇^[34]、长春花碱^[35]等均为有效的抗肿瘤和抗癌药物, 可应用于相应的癌症治疗。此外一些研究也证实了 *Akk* 在肺癌^[36]、结直肠癌^[12]、非小细胞肺癌^[37]等的治疗中发挥了重要作用。因此表明, 其胆汁分泌通路可能是 *Akk* 发挥其功效的重要通路之一。蛋白质的消化和吸收通路中富集到了一种短链脂肪酸——丙酸, 它除能维持肠道健康、缓解肠道炎症外, 在人体其他组织和器官中也可发挥重要作用, 膳食中补充丙酸可通过抑制食欲提高胰岛素敏感性, 并增加能量消耗防止高脂饮食引起的肥胖^[38]。据报道^[9], *Akk* 在体外培养时主要代谢产物为丁酸和丙酸, 而在优化培养基发酵后丙酸呈现显著上调, 一方面说明该培养基更有利于 *Akk* 发挥改善肠道疾病、减肥等作用。但目前也有报道, 机体内有有机酸累积与类风湿性关节炎有关^[39]。由此也表明, 肠道中 *Akk* 活菌数量应保持一定上限, 否则会带来不良健康影响。

Akk 发酵优化培养基通过影响其代谢通路, 这些代谢通路产生代谢产物较硫乙醇酸盐液体培养基显著上调, 一方面表明该培养基组分能使 *Akk* 更好地发挥抗肿瘤、调节机体免疫、缓解肠道炎症等益生功能, 另一方面, 显著下调的代谢产物则从侧面说明如果肠道内 *Akk* 丰度过高可能带来某些疾病风险, 如增加骨关节炎及类风湿性关节炎等患病风险等, 且如果人体本身患有肠道炎症补充 *Akk* 活菌反而会加重病情。

3 结论

目前已知 *Akk* 与人体某些疾病存在重要关联, 但至今为止将其工业化高密度培养依然存在技术难题。本研究对硫乙醇酸盐培养基进行了优化, 筛选出了适合工业化生产的培养基配方, 并通过非靶向代谢组学技术比较分析了 *Akk* 发酵优化培养基和硫乙醇酸盐液体培养基产生的代谢产物之间的差异, 这些代谢产物与 *Akk* 发挥抗炎、抗癌、调节肠-脑轴和肠-肝轴等功能密切相关; 将这些差异性代谢物进行KEGG通路富集, 发现 *Akk* 的蛋白质消化和吸收通路富集最为显著, 证明了影响该菌生长的最重要因素是蛋白质, 同时也表明以此对培养基进行优化的合理性。为该培养基在工业化生产中应用提供了依据, 也为将来 *Akk* 高密度培养以及作为后生元的可能性提供了研究和应用基础。

参考文献:

- [1] LIU Y J, YANG M, TANG L, et al. TLR4 regulates ROR γ t+ regulatory T-cell responses and susceptibility to colon inflammation through interaction with *Akkermansia muciniphila*[J]. *Microbiome*, 2022, 10(1): 1-20. DOI:10.1186/s40168-022-01296-x.
- [2] OTTMAN N, GEERLINGS S Y, AALVINK S, et al. Action and function of *Akkermansia muciniphila* in microbiome ecology, health and disease[J]. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 2017, 31(6): 637-642. DOI:10.1016/j.bpg.2017.10.001.
- [3] CANI P D, DEPOMMIER C, DERRIEN M, et al. *Akkermansia muciniphila*: paradigm for next-generation beneficial microorganisms[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2022, 19(10): 1-13. DOI:10.1038/s41575-022-00650-9.
- [4] ZHANG T, LI Q, CHENG L, et al. *Akkermansia muciniphila* is a promising probiotic[J]. *Microbial Biotechnology*, 2019, 12(6): 1109-1125. DOI:10.1111/1751-7915.1341.
- [5] XIA J F, LV L X, LIU B Q, et al. *Akkermansia muciniphila* ameliorates acetaminophen-induced liver injury by regulating gut microbial composition and metabolism[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(1): e01596-21. DOI:10.1128/spectrum.01596-21.
- [6] MITHIEUX G. Does *Akkermansia muciniphila* play a role in type 1 diabetes?[J]. *Gut*, 2018, 67(8): 1373-1374. DOI:10.1136/gutjnl-2017-315732.
- [7] WANG L J, TANG L, FENG Y M, et al. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurised bacterium blunts colitis associated tumourigenesis by modulation of CD8⁺ T cells in mice[J]. *Gut*, 2020, 69(11): 1988-1997. DOI:10.1136/gutjnl-2019-320105.
- [8] SHIN J, NOH J R, CHOE D, et al. Ageing and rejuvenation models reveal changes in key microbial communities associated with healthy ageing[J]. *Microbiome*, 2021, 9(1): 1-19. DOI:10.1186/s40168-021-01189-5.
- [9] CHEN S J, QIAN K Y, ZHANG G H, et al. *Akkermansia muciniphila* and its outer membrane protein Amuc_1100 prophylactically attenuate 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2022, 614: 34-40. DOI:10.1016/j.bbrc.2022.04.135.
- [10] ZHANG L, WANG Y J, WU F, et al. MDG, an *Ophiopogon japonicus* polysaccharide, inhibits non-alcoholic fatty liver disease by regulating the abundance of *Akkermansia muciniphila*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 196: 23-34. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2021.12.036.
- [11] QU S W, FAN L N, QI Y D, et al. *Akkermansia muciniphila* alleviates dextran sulfate sodium (DSS)-induced acute colitis by NLRP3 activation[J]. *Microbiology Spectrum*, 2021, 9(2): e00730-21. DOI:10.1128/Spectrum.00730-21.
- [12] DERRIEN M, VAUGHAN E E, PLUGGE C M, et al. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(5): 1469-1476. DOI:10.1007/s11277-007-9423-8.
- [13] 李娜. 预防比格犬肥胖的嗜黏蛋白阿克曼菌微胶囊的研制[D]. 长春: 吉林大学, 2020. DOI:10.27162/d.cnki.gjlin.2020.000916.
- [14] LIU X Y, ZHAO F, LIU H, et al. Transcriptomics and metabolomics reveal the adaption of *Akkermansia muciniphila* to high mucin by regulating energy homeostasis[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 1-13. DOI:10.1038/s41598-021-88397-z.
- [15] MACHADO D, ALMEIDA D, SERBRA C L, et al. Uncovering *Akkermansia muciniphila* resilience or susceptibility to different temperatures, atmospheres and gastrointestinal conditions[J]. *Anaerobe*, 2020, 61: 102135. DOI:10.1016/j.anaerobe.2019.102135.
- [16] ALMEIDADO D, MACHADO D, SOUSA S, et al. Effect of emulsification/internal gelation-based microencapsulation on the viability of *Akkermansia muciniphila* upon prolonged storage and simulated gastrointestinal passage[J]. *Food Hydrocolloids for Health*, 2022, 2: 100084. DOI:10.1016/j.fhfh.2022.100084.
- [17] MARTIN-GALLAUSIAUX C, GARCIA-WEBER D, LASHERRMES A, et al. *Akkermansia muciniphila* upregulates genes involved in maintaining the intestinal barrier function via ADP-heptose-dependent activation of the ALPK1/TIFA pathway[J]. *Gut Microbes*, 2022, 14(1): 2110639. DOI:10.1080/19490976.2022.2110639.
- [18] 逢晓阳, 吕加平, 提盼盼, 等. 阿克曼氏粘细菌培养基及其制备方法: CN201710724496.0[P]. 2020-06-16. <https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=kxaUMs6x7-4I2jr5WTdXti3zQ9F92xu0MZHcYonk-lwS3y-OLIR6HV5Aou4rqfRwPXij1PUw9QNO894quLcy-PotYsOTW&uniplatform=NZKPT>.
- [19] AINSLEY DEAN P J, ARIKAN G, OPITZ B, et al. Potential for use of creatine supplementation following mild traumatic brain injury[J]. *Concussion*, 2017, 2(2): CNC34. DOI:10.2217/cnc-2016-0016.
- [20] 常白杨, 汪建明, 王敏, 等. 烟曲霉素及其衍生物生物活性研究进展[J]. *生物技术进展*, 2017, 7(6): 580-586. DOI:10.19586/j.2095-2341.2017.0028.
- [21] TAKAYUKI K, TAEKO U, MADORI O, et al. Fumagillin, a potent angiogenesis inhibitor, induces Kaposi sarcoma-associated herpesvirus replication in primary effusion lymphoma cells[J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2015, 463(4): 1267-1272. DOI:10.1016/j.bbrc.2015.06.100.
- [22] 刘天舒. 巴多昔芬在自身免疫性心肌炎中的作用机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2021. DOI:10.27157/d.cnki.gzhku.2021.004878.
- [23] FU S, CHEN X, LO H W, et al. Combined bazedoxifene and paclitaxel treatments inhibit cell viability, cell migration, colony formation, and tumor growth and induce apoptosis in breast cancer[J]. *Cancer Letters*, 2019, 448: 11-19. DOI:10.1016/j.canlet.2019.01.026.
- [24] LUO P C, WANG Y N, ZHAO C Q, et al. Bazedoxifene exhibits anti-inflammation and anti-atherosclerotic effects via inhibition of IL-6/IL-6R/STAT3 signaling[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2021, 893: 173822. DOI:10.1016/j.ejphar.2020.173822.
- [25] HILL R A, KOUREMENOS K, TULL D, et al. Bazedoxifene—a promising brain active SERM that crosses the blood brain barrier and enhances spatial memory[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2020, 121: 104830. DOI:10.1016/j.psyneuen.2020.104830.
- [26] 王辉. 乌头碱致HT22细胞凋亡的机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2022. DOI:10.27409/d.cnki.gxbnu.2022.001372.
- [27] GHAFARI S, ABBASI A, SOMI M H, et al. *Akkermansia muciniphila*: from its critical role in human health to strategies for promoting its abundance in human gut microbiome[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022: 1-21. DOI:10.1080/10408398.2022.2045894.
- [28] WANG Q, HUANG S Q, LI C Q, et al. *Akkermansia muciniphila* may determine chondroitin sulfate ameliorating or aggravating osteoarthritis[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1955. DOI:10.3389/fmicb.2017.01955.
- [29] DEPOMMIER C, EVERARD A, DRUART C, et al. Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study[J]. *Nature Medicine*, 2019, 25(7): 1096-1103. DOI:10.1038/s41591-019-0495-2.

- [30] PRADO M S A, KEDORR-HACKMANN E R M, SANTORO M I R M, et al. Capillary electrophoretic method for determination of protease inhibitor indinavir sulfate used in human immunodeficiency virus therapy[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2004, 34(2): 441-450. DOI:10.1016/S0731-7085(03)00530-2.
- [31] SHARMA B, SINGH N, SINGH M, et al. Exploitation of HIV protease inhibitor Indinavir as a memory restorative agent in experimental dementia[J]. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2008, 89(4): 535-545. DOI:10.1016/j.pbb.2008.02.012.
- [32] HE X Y, YAN C X, ZHAO S Y, et al. The preventive effects of probiotic *Akkermansia muciniphila* on D-galactose/A β 1C3 mediated Alzheimer's disease-like rats[J]. *Experimental Gerontology*, 2022, 170: 111959. DOI:10.1016/j.exger.2022.111959.
- [33] GORTHI A, ROMERO J C, LORANC E, et al. EWS-FLI1 increases transcription to cause R-loops and block BRCA1 repair in Ewing sarcoma[J]. *Nature*, 2018, 555: 387-391. DOI:10.1038/nature25748.
- [34] KIMS, TANNOCK I, SRIDHARR S, et al. Chemotherapy-induced infiltrative pneumonitis cases in breast cancer patients[J]. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 2012, 18(2): 311-315. DOI:10.1177/1078155211429384.
- [35] NERCAHYANTI A D R, WING M. Cytotoxic potentiation of vinblastine and paclitaxel by L-canavanine in human cervical cancer and hepatocellular carcinoma cells[J]. *Phytomedicine*, 2015, 22(14): 1232-1237. DOI:10.1016/j.phymed.2015.10.007.
- [36] TENG L X, WANG K Y, CHEN W P, et al. HYR-2 plays an anti-lung cancer role by regulating PD-L1 and *Akkermansia muciniphila*[J]. *Pharmacological Research*, 2020, 160: 105086. DOI:10.1016/j.phrs.2020.105086.
- [37] DEROSA L, ROUTY B, THOMAS A M, et al. Intestinal *Akkermansia muciniphila* predicts clinical response to PD-1 blockade in advanced non-small cell lung cancer patients[J]. *Nature Medicine*, 2022, 28(2): 315. DOI:10.1038/s41591-021-01655-5.
- [38] HU J, KYROU I, TAN B K, et al. Short-chain fatty acid acetate stimulates adipogenesis and mitochondrial biogenesis via GPR43 in brown adipocytes[J]. *Endocrinology*, 2016, 157(5): 1881-1894. DOI:10.1210/en.2015-1944.
- [39] JIANG L J, SHANG M M, YU S N, et al. A high-fiber diet synergizes with *Prevotella copri* and exacerbates rheumatoid arthritis[J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2022, 19(12): 1414-1424. DOI:10.1038/s41423-022-00934-6.