

# 从人体肠道菌群及脂代谢的角度比较水苏糖与益生菌纠正肠道失衡的能力

汪清美<sup>1</sup>, 赵培<sup>2,\*</sup>, 陈庆森<sup>2,\*</sup>, 贾彦<sup>2</sup>, 闫亚丽<sup>2</sup>

(1.信阳农林学院制药工程学院, 河南 信阳 464000; 2.天津商业大学生物技术与食品科学学院, 天津 300134)

**摘要:** 人体肠道菌群与健康息息相关, 一旦肠道菌群失调会导致肠道功能紊乱, 引发多种肠道疾病。本实验通过不同肠道疾病人群服用水苏糖、复合益生菌 (compound probiotics, CPb) 和合生元MF-13, 利用Ion Torrent PGM™测序平台等手段, 重点关注粪便中肠道菌群结构以及胆固醇和胆汁酸含量的变化, 探讨3种微生态制剂干预过程中志愿者肠道菌群结构和脂代谢的变化情况。结果显示, 不同肠道疾病人群经微生态制剂干预后, 分析获得1 067个操作分类单元 (operational taxonomic units, OTU); 优势菌门为厚壁菌门 (Firmicutes) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes), 二者占到了总序列数的91.65%, 其中拟杆菌门 (Bacteroidetes) 约占总序列数的70.10%, 其门下的拟杆菌属 (*Bacteroides*) 和普雷沃氏菌属 (*Prevotella*) 为优势菌属, 分别占总序列数的33.1%和33.8%。在门水平上, 水苏糖能促进拟杆菌门而抑制厚壁菌门菌群的增殖, CPb对各菌门丰度变化趋势的影响不明显, MF-13对变形菌门和放线菌门菌群的增殖有促进作用; 3组微生态制剂干预前后菌属丰度变化结果显示, 水苏糖引起便秘和失眠样本中的萨特菌属的丰度明显降低, CPb引起腹泻样本中萨特菌属显著降低; MF-13引起 *Parabacteroides* 的丰度升高。通过对肠道菌群多样性分析发现, 仅Chao1指数在MF-13干预组在干预前期明显升高, 其他多样性指数无明显变化。对肠道菌群结构变化进行聚类和无量多度标度 (non-metric multi-dimensional scaling, NMDS) 分析, 结果显示大部分样本在微生态制剂干预过程中菌群结构都产生变化, 各群体间菌群结构有相互交叠的趋势。利用Metastat统计学分析个体之间存在显著差异的肠道菌群, 发现各微生态制剂干预前后整体OTUs丰度无明显变化, 在志愿者个体之间差异较大。MF-13对肠道胆固醇和胆汁酸的排出有显著促进作用 ( $P < 0.05$ )。结论: 水苏糖对志愿者肠道菌群结构的影响显著, 而CPb和MF-13的影响不显著, 但MF-13能够促进肠道胆固醇和胆汁酸的排放, 有利于肠道胆固醇的代谢, 但干预的持续性不明显。

**关键词:** 肠道菌群; 微生态制剂; 高通量测序技术; 胆固醇; 胆汁酸

## Comparative Efficacy of Stachyose and Probiotics in Ameliorating Intestinal Dysbiosis from the Perspectives of Human Gut Microbiota and Lipid Metabolism

WANG Qingmei<sup>1</sup>, ZHAO Pei<sup>2,\*</sup>, CHEN Qingsen<sup>2,\*</sup>, JIA Yan<sup>2</sup>, YAN Yali<sup>2</sup>

(1. School of Pharmaceutical Engineering, Xinyang Agriculture and Forestry University, Xinyang 464000, China;

2. College of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China)

**Abstract:** The intestinal flora of the human body is closely related to health. Gut microbiota dysbiosis will lead to intestinal dysfunction and, consequently, a variety of intestinal diseases. In this study, subjects with different diseases were requested to take one of three microecological agents, stachyose, composite probiotics (CPb) and synbiotic MF-13. An Ion Torrent PGM™ sequencing platform was used to analyze the structure of intestinal microflora and the contents of cholesterol and bile acid in the feces of the subjects were measured. Our aim was to investigate the regulatory effect of intervention with microecological agents on the intestinal microflora structure and lipid metabolism. The results showed that 1 067 operational

收稿日期: 2023-06-03

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31071522)

第一作者简介: 汪清美 (1983—) (ORCID: 0009-0008-7403-9780), 女, 讲师, 硕士, 研究方向为发酵生物技术。

E-mail: 123313359@qq.com

\*通信作者简介: 赵培 (1978—) (ORCID: 0000-0002-3393-7516), 女, 副教授, 硕士, 研究方向为食源性生物活性物质与肠道健康。E-mail: zhaopei@tjcu.edu.cn

陈庆森 (1957—) (ORCID: 0000-0003-2573-3297), 男, 教授, 硕士, 研究方向为发酵生物技术、功能成分与肠道健康的关系。E-mail: chenqs1689@163.com

taxonomic units (OUT) were obtained from the fecal microbial samples from all subjects. The dominant bacteria were Firmicutes and Bacteroidetes, altogether accounting for 91.65%, and Bacteroidetes accounting for about 70.10% of the total number of sequences. *Bacteroides* and *Prevotella* were the dominant genera, accounting for 33.1% and 33.8% of the total sequences, respectively. At the phylum level, stachyose promoted the proliferation of Bacteroidetes, but inhibited the proliferation of Firmicutes. CPb had no significant effect on the abundance of each phylum, while MF-13 promoted the proliferation of Proteobacteria and Actinobacteria. Stachyose significantly decreased the abundance of *Sutterella* in subjects with constipation and insomnia, CPb significantly decreased the abundance of *Sutterella* in subjects with diarrhea, and MF-13 increased the abundance of *Parabacteroides*. The analysis of intestinal microflora diversity showed that Chao1 index significantly increased during the early period of MF-13 intervention, while there were no significant changes in other diversity indexes. Cluster analysis and non-metric multi-dimensional scaling (NMDS) analysis showed that microecological preparation intervention changed the intestinal microbiota structure in most of the samples, and the microflora structure of all populations showed an overlapping tendency. The intestinal microflora species that significantly differed between individuals were analyzed using Metastat statistics, and it was found that there was no significant change in the abundance of OTUs before and after intervention with each microecological agent, while there was a significant difference between individual subjects. MF-13 significantly promoted the fecal excretion of cholesterol and bile acids ( $P < 0.05$ ). In conclusion, stachyose has an obvious influence on the intestinal microflora structure of volunteers, while CPb and MF-13 do not. However, MF-13 can increase the intestinal excretion of cholesterol and bile acid, which is beneficial to the metabolism of intestinal cholesterol, but the durability of this effect is poor.

**Keywords:** gut microbiota; microecological agents; high-throughput sequencing technology; cholesterol; bile acids

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230603-018

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2023)19-0118-13

引文格式:

汪清美, 赵培, 陈庆森, 等. 从人体肠道菌群及脂代谢的角度比较水苏糖与益生菌纠正肠道失衡的能力[J]. 食品科学, 2023, 44(19): 118-130. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230603-018. <http://www.spkx.net.cn>

WANG Qingmei, ZHAO Pei, CHEN Qingsen, et al. Comparative efficacy of stachyose and probiotics in ameliorating intestinal dysbiosis from the perspectives of human gut microbiota and lipid metabolism[J]. Food Science, 2023, 44(19): 118-130. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230603-018. <http://www.spkx.net.cn>

目前, 依据微生态学原理制成的微生态制剂(microecologics)在治疗便秘、腹泻等肠道疾病方面有很普遍的应用。益生菌、益生元和合生元都属于微生态制剂<sup>[1-2]</sup>。报道已揭示人体携带有超出人体细胞数十倍甚至上百倍的微生物, 其编码的基因在数量上远远超出人类自身编码的基因, 仅在肠道中寄居的微生物就有约1 800个属, 至少40 000种细菌, 这些细菌通称为肠道菌群, 即“人体肠道元基因组”<sup>[3]</sup>。虽然人体肠道内栖生着的微生物数量高达 $10^{14}$ 个, 但细菌数量和种类却随着胃肠道微生物密度增高逐步增加, 这表明肠道菌群分布是不均匀的<sup>[4]</sup>。

研究显示, 人体肠道菌群结构受人体内环境和外环境共同作用和影响, 宿主基因型、年龄、饮食、疾病、药物等成为影响人体肠道菌群结构的主要因素<sup>[2-5]</sup>。在这些因素的影响下, 个体与个体之间肠道菌群的多样性和结构也存在着差异。Wang Fang等<sup>[6]</sup>通过Illumina测序分析了中国广西巴马县年龄在85~99岁和100~108岁两组老年人的肠道菌群。结果显示, 在百岁老人中, 肠道菌群的

变化与年龄和高纤维膳食的摄入量相关。大量研究表明, 肠道正常菌群对宿主健康有着十分重要的功效<sup>[7-8]</sup>。正常情况下, 人体肠道内菌群结构处于平衡状态, 若这种平衡被外界扰乱, 就会造成菌群失调, 导致肠道功能紊乱, 甚至引发或加重疾病。许多研究也证实肠道菌群失调与便秘、腹泻、肠易激综合征等肠道疾病相关。因此, 许多研究试图通过改善肠道微生物菌群结构来对一些疾病进行针对性治疗, 使人体恢复和维持健康状态<sup>[9]</sup>。总之, 胃肠道的健康直接影响着人们的生活质量和生活状态以及健康水平, 所以利用益生菌或益生元等非临床治疗的手段来达到健康的目的显得尤为重要<sup>[10-11]</sup>。本研究选择一组特殊的志愿者为研究对象, 从改善肠道微生态着手, 利用Ion Torrent PGM™测序平台观察微生态制剂干预后各类肠道疾病志愿者肠道菌群结构的变化, 同时分析测定肠道粪便中胆固醇和胆汁酸代谢的变化。利用生物信息学的分析, 建立肠道菌群结构变化与脂代谢产物变化的相关性图谱, 探究服用微生态制剂纠正志愿者肠道菌群结构失衡和改善脂代谢的能力, 旨在为微生态

制剂在治疗人体肠道疾病和改善人体健康方面提供一定的理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

水苏糖、复合益生菌 (compound probiotics, CPb) 和合生元MF-13由河北一然生物科技有限公司提供, 其组成见文献[12]。

总胆固醇测定试剂盒 北京北化康泰临床试剂有限公司; 总胆汁酸测定试剂盒 南京建成生物工程研究所; QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit 德国QIAGEN公司; TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit 宝生物工程(大连)有限公司; Qubit® dsDNA HS Assay Kit 美国Invitrogen公司; *Pfu* DNA Polymerase 美国Thermo Scientific公司; Ion Plus Fragment Library Kit、Agencourt® AMPure® XP Kit、Ion Xpress™ Barcode Adapters Kit、Ion PGM™ Template OT2 400 Kit、Ion PGM™ Sequencing 400 Kit v2 美国Life Technologies公司。

### 1.2 仪器与设备

900超低温冰箱、磁力架 美国Thermo Scientific公司; SW-CJ-2DD单人双面净化工作台 苏州净化设备有限公司; DYY-2C电泳仪 北京六一仪器厂; 508-U001 Ion Torrent PGM测序平台 美国Life Technologies公司; 2100生物分析仪 美国Agilent公司; Qubit 2.0荧光计 美国赛默飞世尔公司; Biowave DNA II-3分光光度计 英国柏诺公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 招募志愿者以及粪便样本采集

本研究招募了一组特殊志愿者, 来自合作单位河北一然生物科技有限公司, 参与本研究的志愿者12名(6男、6女), 均为其公司职员和家属, 其肠道健康状况包括健康、便秘、腹泻、排便不规律以及口臭和失眠等症状(其中便秘、腹泻症状由临床医学给定的症状界定, 其他为自述症状)。在完全符合伦理道德情况下, 与志愿者说明实验目的和告知实验流程, 对志愿者进行培训。微生态制剂干预方法参考文献[24]。实验期间, 要求志愿者不服用抗生素药物以及其他药物。

粪便采集: 发给志愿者粪便收集袋、采集样本的棉棒、保存样本的冻存管, 经培训后, 自行采集粪便样本, 将采集的粪便样品立即放入-20℃冷冻环境中。于干冰环境中4 h内运送至实验室, 存放于-80℃冰箱。采集样本的详细信息见表1。

表1 本研究粪便样本收集信息

Table 1 Information collected in this study

样本	健康状况	干预制剂	干预阶段		
			前	中	后
H1	健康	水苏糖	H1.P	H1.S.1, H1.S.3, H1.S.4	
H2		CPb	H2.P	H2.S.3, H2.S.4	
H3	便秘	MF-13合生元	H3.P	H3.S.2, H3.S.3, H3.S.6, H3.S.8	
C1		水苏糖	C1.P	C1.S.1, C1.S.3, C1.S.4	
C2	水苏糖	C2.P	C2.S.1		
D1	腹泻	CPb	D1.P	D1.S.1, D1.S.2	
S1		水苏糖	S1.P	S1.S.1, S1.S.2, S1.S.3, S1.S.4, S1.S.6	
A1	腹胀	水苏糖	A1.P	A1.S.1, A1.S.2, A1.S.3, A1.S.4	
T1		CPb	T1.P	T1.S.1, T1.S.2, T1.S.4, T1.S.5	
T2	口气异常	MF-13合生元	T2.P	T2.S.1, T2.S.3, T2.S.9	
I1		水苏糖	I1.P	I1.S.1, I1.S.2, I1.S.3, I1.S.5	
I2	失眠	CPb	I2.P	I2.S.3, I2.S.4, I2.S.6	

注: 样本编号中, 第1个大写字母中, H.健康志愿者; C.便秘志愿者; D.腹泻志愿者; S.大便异常志愿者; A.腹胀志愿者; T.口气异常志愿者; I.失眠志愿者。第1个数字表示志愿者序号。第2个大写字母中, P.干预前; S.干预中; A.干预后。第2个数字表示干预的周数。比如: H1.P. 1号健康志愿者干预前; C2.S.1. 2号便秘志愿者干预第1周; D1.A. 1号腹泻志愿者干预后。

#### 1.3.2 粪便微生物16S rRNA高通量测序

粪便微生物DNA的提取参考文献[12]。将DNA提取液适当稀释, 结果 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 在1.8~2.0之间; 取样品DNA提取液5 μL, 采用1%的琼脂糖凝胶进行电泳, 凝胶成像仪下观察DNA条带状态, 结果显示获得了完整且浓度较高的粪便细菌DNA。16S rRNA V3区的聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增参考文献[12]。按照Ion Plus Fragment Library Kit和Ion Xpress™ Barcode Adapters Kit试剂盒说明书进行测序文库的构建。

按照Ion PGM™ Template OT2 400 Kit试剂盒说明书配置模板制备体系, 最后按照Ion OneTouch 2仪器标准操作说明进行测序模板的制备, 按照Ion OneTouch™ ES操作规范并利用Ion PGM™ Template OT2 200 Kit试剂盒配置富集和洗脱反应体系, Ion OneTouch™ ES仪器自动进行离子微球颗粒 (ion sphere particles, ISPs) 的富集。上机测序操作参见文献[12]。

#### 1.3.3 粪便中胆固醇含量的检测

参照Kim等<sup>[13]</sup>方法, 称取粪便样品0.2 g, 转入10 mL离心管, 加入5 mL氯仿-甲醇 (2:1, *V/V*), 充分匀浆。匀浆液以4 000 r/min离心10 min, 取2 mL上清移入干净10 mL离心管, 65℃水浴条件下用N<sub>2</sub>吹干, 残渣中加5 mL甲醇溶解, 按照总胆固醇试剂盒说明书测定提取液中胆固醇的质量浓度, 并进一步计算出粪便中的胆固醇含量。

#### 1.3.4 粪便中总胆汁酸含量的测定

用10 mL离心管称取冻存的粪便样品约500 mg, 加入5 mL蒸馏水, 充分匀浆, 匀浆液4 000 r/min离心10 min, 取上清液<sup>[14]</sup>, 按照总胆汁酸检测试剂盒说明书测定上清液中总胆汁酸质量浓度, 并进一步计算出粪便中的胆汁酸含量。



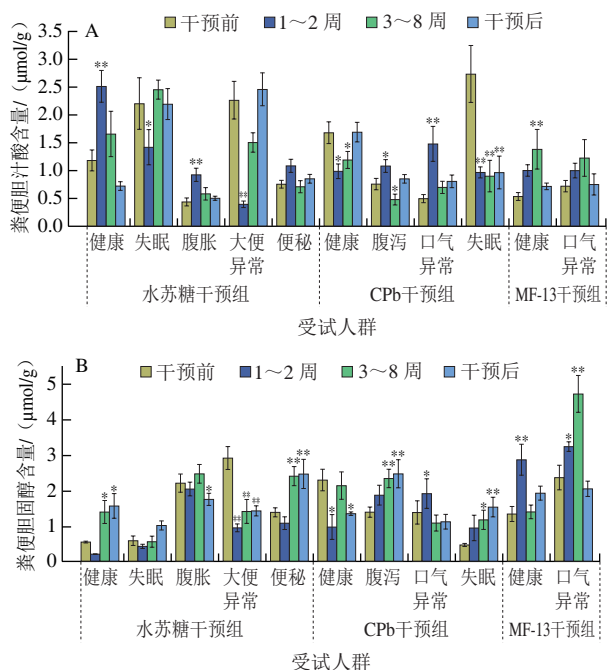
1.4 数据分析

测序数据的生物信息学及多变量统计学分析方法参见文献[12]。

2 结果与分析

2.1 微生态制剂干预后粪便中胆汁酸和胆固醇含量的变化

如图1所示,各干预组中粪便胆汁酸和胆固醇的含量波动较大,干预过程中均有显著或极显著变化,但整体变化趋势不明显。从胆汁酸含量的变化趋势来看,微生态制剂干预1~2周时,几乎所有样本较干预前都有显著变化,但在干预3~8周或干预后,除CPb组的失眠样本外,胆汁酸含量基本上又恢复到干预前水平的趋势,但含量整体上高于干预前水平。多数干预组胆固醇含量在干预3~8周或干预后阶段与干预前相比有显著变化 ( $P<0.05$ 、 $P<0.01$ )。多数样本(如水苏糖干预组和CPb干预组)结果显示,胆汁酸和胆固醇水平表现出此消彼长的关系,其因可能是胆汁酸的肝肠循环所致,即当肠道胆汁酸随粪便排放量增加或减少时,胆固醇通过在肝脏中代谢来回补肠道胆汁酸的损失,引起肠道对胆固醇吸收增强或减弱<sup>[14]</sup>,而使粪便当中胆固醇含量呈现出减少或增加的趋势。而在MF-13干预组中,胆汁酸和胆固醇水平变化趋势呈正相关,且对促进肠道中胆汁酸和胆固醇排出有较明显的作用,说明MF-13可能是通过影响胆汁酸的正反馈调节来使肠道中胆汁酸和胆固醇排出量增加。



与干预前相比, \*差异显著 ( $P<0.05$ ); \*\*差异极显著 ( $P<0.01$ )。

图1 各人群粪便中胆汁酸(A)和胆固醇(B)含量的变化

Fig. 1 Changes in bile acid (A) and cholesterol (B) contents in feces of different populations

为进一步探究3种微生态制剂对粪便胆汁酸和胆固醇含量的影响,通过箱线图将其在干预各阶段的变化趋势直观地展示出来。从图2A中可以看出,水苏糖和CPb干预组中胆汁酸含量整体水平波动,变化趋势不明显,且干预前后无显著性差异;而MF-13干预组中粪便中胆汁酸水平随着干预时间延长呈持续增长的趋势,整体在3~8周时增长显著 ( $P<0.05$ ),但在干预后有所回落,接近干预前水平。从图2B中可以看出,水苏糖和CPb干预组中胆固醇含量变化总体呈先下降后上升的趋势, MF-13干预组中胆固醇平均含量变化趋势与胆汁酸相似,在3~8周时最高和最低值差异很大,停止干预后回到干预前的平均水平。说明3种微生态制剂在干预过程中对粪便胆汁酸和胆固醇含量影响最为显著是MF-13,其能够促进肠道中胆汁酸和胆固醇的排出。但胆汁酸和胆固醇均在3种微生态制剂干预后(即停止干预)含量恢复至干预前水平,表明微生态制剂对肠道胆汁酸和胆固醇的代谢可能有改善作用,但没有持续性的影响。

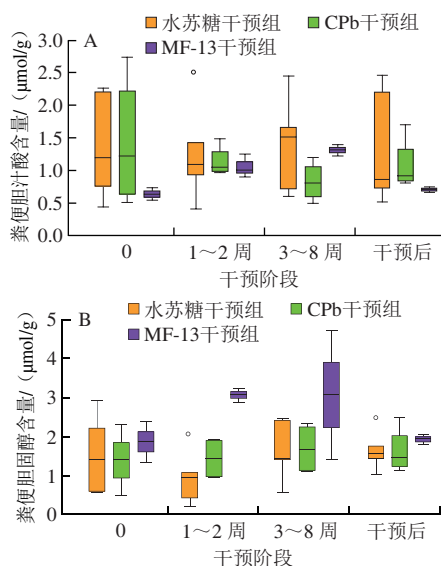


图2 3种微生态制剂对粪便中胆汁酸(A)和胆固醇(B)含量的影响

Fig. 2 Effects of three microecological agents on contents of bile acids (A) and cholesterol (B) in feces

2.2 志愿者粪便微生物16S rRNA V3区测序文库的构建

经StepOnePlus™实时荧光PCR仪扩增定量,结果显示,各样本文库浓度在50~300 pmol/L范围内,均达到测序要求 ( $\geq 10$  pmol/L)。通过Ion Torrent PGM高通量测序平台对样品文库进行测序,最终得到5 907 273条原始序列,序列长度大多分布在170~200 bp范围内,由于细菌16S rRNA基因的V3区长度为180 bp左右,所以测序基本符合V3区要求。对下机数据进行质控,在Bio-Linux操作系统下进行fastqc操作,最终,通过NGStoolkits软件过滤掉序列长度低于50 bp和质量低于Q20的序列,得到2 659 306条高质量序列。

以97%序列一致性为前提, 经过Usearch软件对所有样品的全部Tags序列进行聚类, 划分得到1 067个操作分类单元(operational taxonomic units, OTU), 其中有907个OTU鉴定到科, 666个OTU鉴定到属, 587个OTU鉴定到种, 根据物种注释情况, 统计每个样品注释到各分类水平上的序列数目, 由此可以了解各分类水平的整体注释情况, 结果见图3。

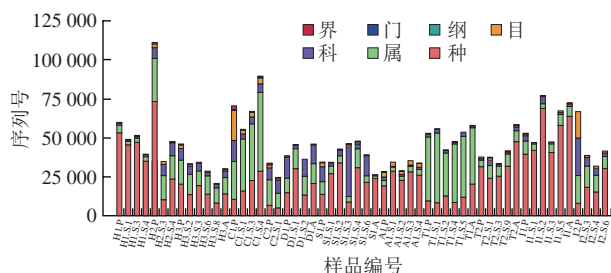


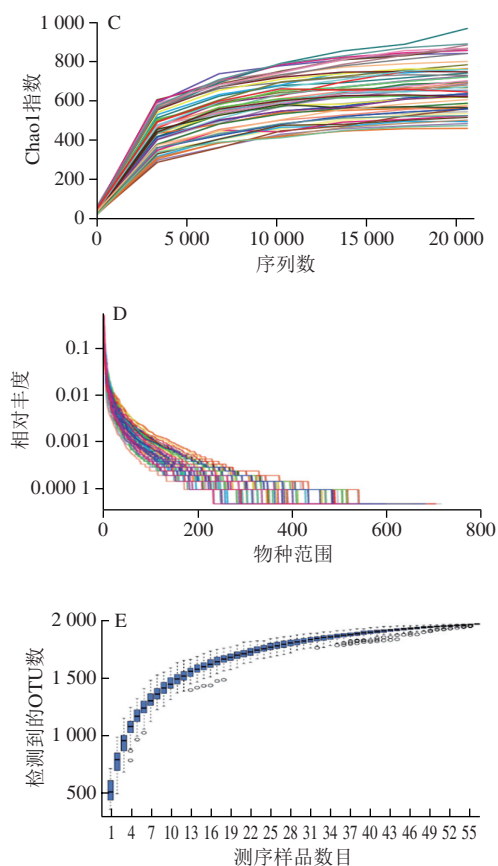
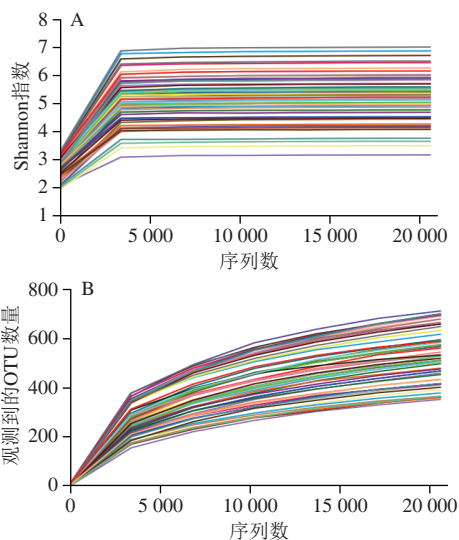
图3 粪便微生物的OTU聚类 and 注释情况统计

Fig. 3 Clustering and annotation statistics of OTU from fecal microbial samples

## 2.3 志愿者肠道菌群 $\alpha$ 多样性分析

### 2.3.1 测序深度分析

如图4A所示, 随着测序量的增大, 所有样本的Shannon指数都到达平台期, 说明在此测序量下所有样本中绝大多数菌群都能被发现。图4B显示, 随着测序数据量的增加, 分析得到的类群数目也逐渐增长, 最终曲线趋于平缓, 说明测序深度已经基本覆盖到样品中所有的物种。如图4C所示, 随着物种范围的扩大, 所有样品Chao1指数基本达到饱和, 说明所有样本中绝大多数物种都被发现。如图4D所示, 随着OTU种类的增多, 曲线趋于水平, 反映了较好的物种丰度和均匀度。用于判断样本量是否能充分估计物种丰富度的物种累积曲线如图4E所示, 随着样本量的增加, 曲线趋于平缓, 说明抽样量充分, 可以进行数据分析。



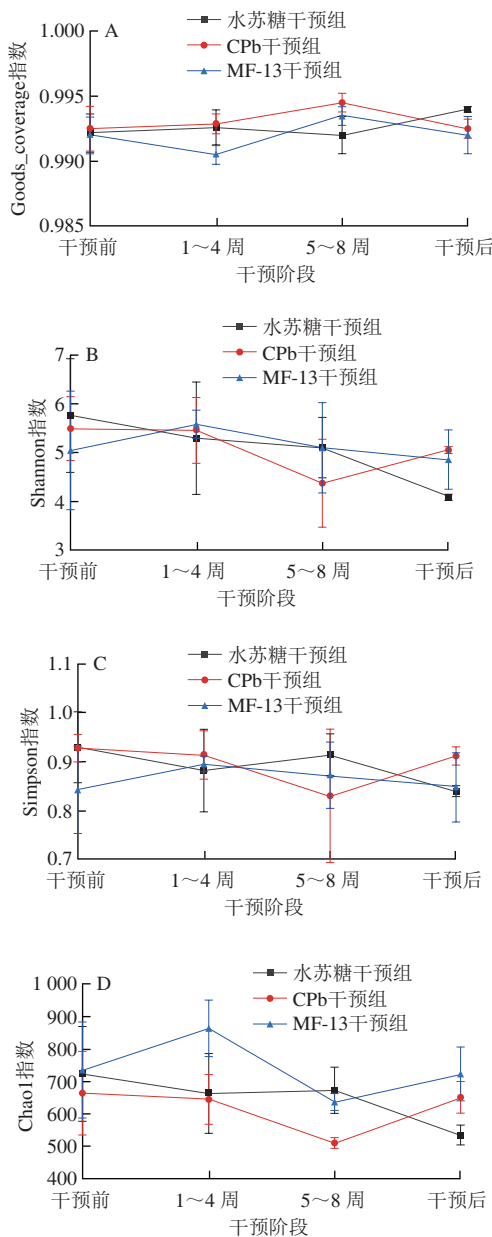
A. Shannon曲线; B. 稀释曲线; C. Chao1曲线;  
D. 相对丰度曲线; E. 物种累积曲线。

图4 志愿者肠道菌群多样性分析

Fig. 4 Analysis of intestinal flora diversity of the volunteers

### 2.3.2 多样性指数分析

如图5所示, Goods\_coverage指数在3种微生态制剂的各干预阶段呈无规则小幅度波动状, 说明人体肠道菌群在各微生态制剂干预前后物种多样性并无明显变化。Shannon和Simpson指数变化总体趋势较为相似: 在干预1~4周阶段内, MF-13干预组Shannon和Simpson指数均有所升高, 而水苏糖和CPb干预组Shannon和Simpson指数均有所下降; 在干预5~8周和干预后阶段, 水苏糖干预组和MF-13干预组Shannon指数持续均呈下降趋势, Simpson指数干预后与5~8周相比均有所下降, 而CPb干预组Shannon和Simpson指数均为先下降后升高。水苏糖和CPb干预组的Chao1指数在干预阶段呈下降趋势, MF-13干预组Chao1指数1~4周阶段明显升高, 但随后的干预阶段呈下降趋势。各干预组中Shannon指数、Simpson指数和Chao1指数变化说明微生态制剂干预前后物种的多样性以及均匀度变化是复杂的, 但整体来说变化不大。



A. Goods\_coverage多样性指数曲线; B. Shannon多样性指数曲线; C. Simpson多样性指数曲线; D. Chao1多样性指数曲线。

图5 微生态制剂对肠道微生物多样性指数的影响

Fig. 5 Effects of microecological agents on gut microbial diversity indexes

2.4 微生态制剂对志愿者肠道菌群在门和属水平上丰度的影响

2.4.1 门水平的丰度变化

在所得到的每个OTU包含的序列中, 选取丰度最高的为代表序列, 进而以此来划分细菌分类地位, 最后运用R软件对所有样本在门水平和属水平上作相对丰度柱状图, 如图6所示。在门水平上选取每个样本最大丰度排名前十的物种, 所有OTU被划分为10个菌门, 即疣微菌门 (Verrucomicrobia)、TM7菌门、无壁菌门 (Tenericutes)、互养菌门 (Synergistetes)、蓝细菌门

(Cyanobacteria)、梭杆菌门 (Fusobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、变形菌门 (Proteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)。其中优势菌门为厚壁菌门 (Firmicutes) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes), 占到了总序列数的91.65%, 其中拟杆菌门 (Bacteroidetes) 约占总序列数的70.10%, 厚壁菌门 (Firmicutes) 则约占总序列数的21.55%。其次是变形菌门 (Proteobacteria), 约占总序列数的7.30%, 放线菌门约占总序列数的0.85%。无壁菌门 (Tenericutes)、互养菌门 (Synergistetes)、TM7菌门和疣微菌门 (Verrucomicrobia) 等在各样品中所占比例基本都不足0.5%, 还有0.1%左右的无法确定具体分类地位的细菌 (Unassigned)。

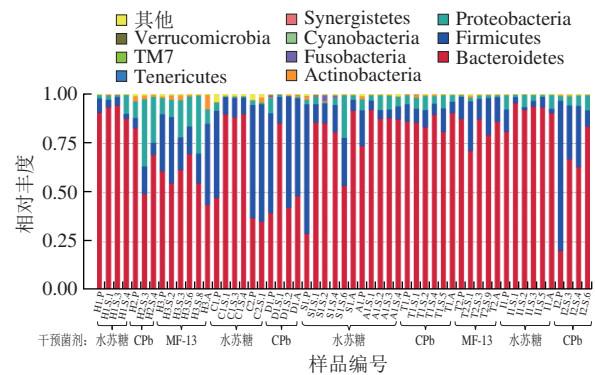


图6 各物种在门水平上的相对丰度

Fig. 6 Relative abundance of dominant phyla

水苏糖干预组各样本中拟杆菌门相对丰度在干预后整体上均有所升高, 而厚壁菌门相应有所降低, 两者大致呈此消彼长的关系, 其中, 便秘 (C) 和大便异常 (S1) 两种样本中拟杆菌门和厚壁菌门的相对丰度变化幅度较大, 拟杆菌门相对丰度分别由47.55%和29.18%增长至89.52%和69.96% (干预前到实验的最后一个阶段, 下同), 厚壁菌门相对丰度分别由44.11%和65.82%降低至8.93%和11.99%; 此外, 变形菌门相对丰度在水苏糖组各样本中变化较明显的为便秘 (C) (由4.21%降至0.51%)、大便异常 (S1) (由2.27%升至16.01%) 和失眠 (I1) (由7.50%降至3.77%) 这3类样本; 说明水苏糖对不同肠道环境的个体影响存在一定的差异; 放线菌门和梭杆菌门所占丰度较小, 除健康 (H1) 和大便异常 (S1) 样本外, 其余均无明显变化。CPb干预组中, 拟杆菌门和厚壁菌门相对丰度在失眠 (I2) 样本中分别呈现增长和降低的趋势, 而在健康 (H2) 样本中则变化趋势与前者相反, 在其余样本 (腹泻 (D1)、口气异常 (T1)) 中变化幅度不大; 变形菌门相对丰度在腹泻样本中由7.8%降至0.50%, 而在其余样本 (H2、T1、I2) 中有增长趋势; 放线菌门和梭杆菌门相对丰度在各



样本中整体变化不明显。MF-13干预组中,拟杆菌门和厚壁菌门相对丰度整体均无明显变化;而变形菌门和放线菌门相对丰度呈增长趋势,健康(H3)样本和口气异常(T2)样本中变形菌门分别由8.26%和0.8%增长至16.02%和1.50%,而放线菌门分别由0.75%和0.12%增长至2.26%和0.44%,梭杆菌门相对丰度几乎没有变化。

从各类志愿者样本来看,在微生态制剂干预前,同类志愿者之间肠道菌群在门水平上的结构存在差异。健康人群(H1、H2、H3,分别由水苏糖、CPb和MF-13干预)肠道菌群在门水平上的变化表现为:H1样本拟杆菌门、放线菌门和梭杆菌门相对丰度增高,而厚壁菌门和变形菌门相对丰度下降。H2样本拟杆菌门相对丰度有所降低,厚壁菌门和变形菌门相对丰度增加,放线菌门和梭杆菌门相对丰度变化趋势不明显;H3样本拟杆菌门、厚壁菌门和梭杆菌门相对丰度变化幅度较小,而放线菌门和变形菌门相对丰度增长趋势较明显。说明在日常饮食不受控制的前提下,3种微生态制剂对健康志愿者肠道菌群丰度有不同的影响,有较为突出的个体差异,总地来看,水苏糖对肠道菌群拟杆菌门和厚壁菌门比例的调节作用最明显。便秘人群(C1、C2均由水苏糖干预)肠道菌群门水平上的变化为:拟杆菌门相对丰度大幅增长,厚壁菌门和变形菌门相对丰度明显降低,而放线菌门和梭杆菌门变化趋势不明显。说明水苏糖对便秘人群肠道菌群结构有明显的调节作用,并且在干预后各菌门的丰度水平逐渐接近于同组健康人群,此外,包含有很多病原菌的变形菌门丰度降低,可能也对患者的肠道健康起到积极作用。失眠人群I1、I2两个样本(分别由水苏糖和CPb干预)的拟杆菌门和厚壁菌门丰度变化趋势相同,而变形菌门丰度与其变化趋势相反。说明CPb与水苏糖在调节拟杆菌门和厚壁菌门丰度变化有相似作用,而CPb中包含的各种外源益生菌可能同时对变形菌门的增殖产生促进作用。口气异常人群(T1、T2,分别由CPb和MF-13干预)两样本干预前后肠道菌群门水平结构均相似,干预后,拟杆菌门和厚壁菌门相对丰度变化不大,而变形菌门和放线菌门丰度均有所升高。说明CPb和MF-13自身携带的外源益生菌可能主要通过改变这两者的丰度来调节肠道菌群。腹泻样本(D1,由CPb干预)中变化趋势较为明显的是变形菌门和放线菌门,同以上CPb组干预结果;腹胀样本(A1,由水苏糖干预)和大便异常样本(S1,由水苏糖干预)菌群变化趋势同以上水苏糖组干预结果。

通过以上结果可以得出,水苏糖对人体肠道菌群中拟杆菌门和厚壁菌门的相对丰度影响较大,能大幅提高拟杆菌门丰度而降低厚壁菌门丰度,并以此来影响整体肠道菌群结构。有调查报告显示,成年人肠道内拟杆菌门和厚壁菌门存在一种相互促进的共生关系,且两者的

比例与肥胖之间有直接关系,两者比例降低会促进肥胖,而拟杆菌门丰度升高或厚壁菌门降低也伴随着体脂量的减少<sup>[15]</sup>。以此推断水苏糖可能具备预防人体肥胖发生的功能。CPb干预组中,可能由于样本量较少,除个别样本外,拟杆菌门和厚壁菌门相对丰度整体变化规律不明显,在整个干预过程中呈现波动,对肠道菌群整体结构影响较小,这也可能与志愿者的饮食、生活习惯不同以及干预时间较短有关。MF-13对拟杆菌门和厚壁菌门相对丰度无明显影响,而对变形菌门和放线菌门菌群的增殖有促进作用,可能是MF-13含有的益生元为其含有的外源益生菌同时提供了增殖底物,并促进了肠道内变形菌门和放线菌门菌群的增殖。

#### 2.4.2 属水平的丰度变化

在属水平上选取每个样本最大丰度排名前十的物种,如图7所示,包括拟杆菌属(*Bacteroides*)、普雷沃氏菌属(*Prevotella*)、毛螺菌属(*Lachnospira*)、巨型球菌属(*Megasphaera*)、萨特氏菌属(*Sutterella*)、巨单胞菌属(*Megamonas*)、柔嫩梭菌属(*Faecalibacterium*)、*Parabacteroides*、光岗菌属(*Mitsuokella*)以及小类杆菌属(*Dialister*)。其中优势菌属为同属于拟杆菌门下的拟杆菌属(*Bacteroides*)和普雷沃氏菌属(*Prevotella*) (各占总序列数的33.1%和33.8%)。

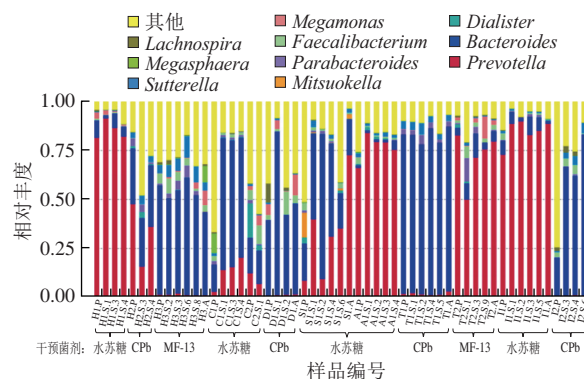


图7 各物种在属水平上的相对丰度  
Fig. 7 Relative abundance of dominant genera

在水苏糖干预组中,普雷沃氏菌属(*Prevotella*)随着干预时间的延长相对丰度呈增长趋势,而拟杆菌属(*Bacteroides*)则波动变化,其中变化较明显的为便秘样本C1和大便异常样本S1,样本C1在水苏糖干预后,普氏杆菌属和拟杆菌属分别由2.84%和13.79%增长至16.49%和64.64%;在干预过程中样本S1普氏杆菌属和拟杆菌属丰度均有增长趋势,但停止干预后拟杆菌属又回降至干预前水平,而普氏杆菌属丰度由8.40%增长至72.90%;毛螺菌属(*Lachnospira*)、柔嫩梭菌属(*Faecalibacterium*)和巨型球菌属(*Megasphaera*)

在干预过程中相对丰度普遍呈下降趋势；萨特氏菌属 (*Sutterella*) 相对丰度变化较明显的是样本C1，其由最1.45%降低至0.18%，其次是样本I1，其由1.26%降低至0.31%，而在其余样本中变化不大；巨单胞菌属 (*Megamonas*) 相对丰度在样本H1和样本A1中有所降低，分别由3.4%和0.2%降低至0.68%和0.05%，而在样本C1中由0.01%增至0.34%；*Parabacteroides* 相对丰度在样本S1和I1中变化幅度较大，分别由1.24%和0.32%降低至0.25%和0.05%，而在其余样本中变化不大；除样本S1外，其余各样本中的光岗菌属 (*Mitsuokella*) 相对丰度几乎没有变化；小类杆菌属 (*Dialister*) 在各样本中丰度有增高趋势，但变化不显著。在CPb干预组中，普雷沃氏菌属 (*Prevotella*) 和拟杆菌属 (*Bacteroides*) 相对丰度总体呈增长趋势，在失眠样本I2中拟杆菌属相对丰度大幅增长，由19.8%增长至82.84%；毛螺菌属 (*Lachnospira*) 和柔嫩梭菌属 (*Faecalibacterium*) 在各样本中相对丰度基本变化不大，只在腹泻样本D1中变化明显，毛螺菌属相对丰度由9.75%降至0.23%，而柔嫩梭菌相对丰度在大幅升高之后又降低到原水平；萨特氏菌属 (*Sutterella*) 相对丰度在样本D1中降低，在样本I2中由0.78%增至5.23%；巨型球菌属 (*Megasphaera*)、*Parabacteroides*、光岗菌属 (*Mitsuokella*)、小类杆菌属 (*Dialister*) 和巨单胞菌属 (*Megamonas*) 相对丰度则无显著变化。在MF-13干预组中，口气异常样本T2中普雷沃氏菌属 (*Prevotella*) 相对丰度先降低后升高，但最终低于干预前水平，小类杆菌属 (*Dialister*) 和毛螺菌属 (*Lachnospira*) 相对丰度呈降低趋势，萨特氏菌属 (*Sutterella*) 呈现升高趋势，其余菌属变化不明显；健康样本H3中菌群相对丰度变化则表现为*Parabacteroides* 和巨单胞菌属 (*Megamonas*) 略微升高，毛螺菌属 (*Lachnospira*) 略微降低。

以上结果表明3种微生态制剂均能提高普雷沃氏菌属、拟杆菌属的相对丰度，而对其余菌属相对丰度影响主要表现在病理（便秘、腹泻、大便异常以及腹胀）人群样本中，如水苏糖能降低便秘和失眠样本中变形菌门下的萨特菌属的相对丰度，CPb有降低腹泻样本中萨特菌属以及升高具有抗炎性的柔嫩梭菌属 (*Faecalibacterium*) 相对丰度的作用，MF-13能够提高样本中*Parabacteroides* 的相对丰度，有研究显示，健康人肠道中*Parabacteroides* 水平高于肠道疾病患者<sup>[16]</sup>。说明微生态制剂对肠道菌群结构影响特点虽有不同，但是均能通过降低有害菌或提高有益菌的丰度来改善肠道病理状况。

不同志愿者肠道内核心菌属呈现较大的差异性，大致分为两类：一类以拟杆菌属为优势菌属，另一类以普雷沃氏菌属为优势菌属。以为拟杆菌属为优势菌属的为健康 (H2、H3)、便秘 (C1)、腹泻 (D1)、口气异常

(T1)、失眠 (I2) 志愿者，拟杆菌属的平均相对丰度为60.70%，而以普雷沃氏菌属为优势菌属的为健康、腹胀 (A1)、口气异常 (T2)、失眠 (I1) 志愿者，普雷沃氏菌属的平均相对丰度为79.92%。这与Wu等<sup>[17]</sup>的研究相符，其将居民的肠道菌群划分为以拟杆菌属 (*Bacteroides*) 和普雷沃氏菌属 (*Prevotella*) 为核心的两种独立肠道型 (enterotype)<sup>[18]</sup>。

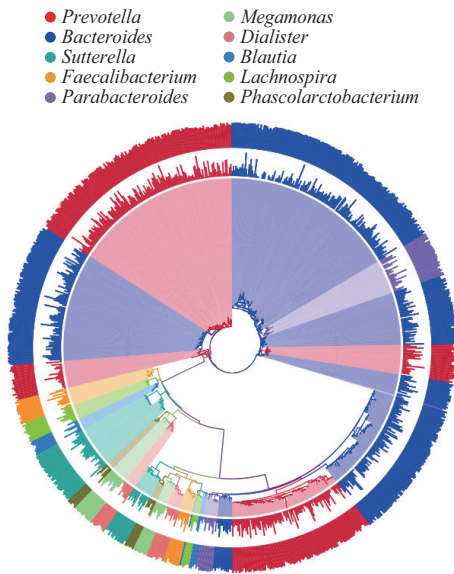
在以普雷沃氏菌属 (*Prevotella*) 为核心菌属的样本 (如H1、H2、A1、T2、I1) 中，微生态制剂干预前后，除H2样本的核心菌属相对丰度有较大波动外，大部分样本核心菌属相对丰度未有大幅度变化；在以拟杆菌属 (*Bacteroides*) 为核心菌属的样本 (如H3、D1、T1) 中，拟杆菌属相对丰度在微生态制剂干预过程中有一些波动，其中腹泻样本 (D1) 在CPb干预第1周拟杆菌属菌群丰度迅速升高，但随着干预时间的延长又恢复至接近干预前水平。以上结果说明，各类微生态制剂对人体肠道菌群核心菌属的影响较小，同时也印证了肠道菌群是一个处于动态平衡的生态系统，在人类进化过程当中，通过长期饮食结构、生活习惯及生存环境影响而形成的肠型结构是稳定的，其稳定与人体健康息息相关<sup>[19-20]</sup>，因此，本研究有力地证明，短时间内在外界的扰动或干预下，肠道原有的菌群结构不会发生较大改变。而个别样本与以上变化结果不同，如便秘样本C1、大便异常样本S1及失眠样本I2在干预前后核心菌属均有波动甚至改变，但在干预后基本保持稳定，说明病理状态下的样本可能本身存在肠道菌群失调的状况，而在微生态制剂干预作用下，可逐步恢复到稳定的健康状态，也可能由于取样不均匀的原因，造成了核心菌属的较大波动。

## 2.5 微生态制剂对肠道菌群整体结构的影响

### 2.5.1 样品聚类分析和降维分析

利用多变量统计学和UniFrac系统发育进化方法分析微生态制剂干预后人体肠道菌群整体结构的变化。首先，为了进一步研究OTUs的系统进化关系以及后续 $\beta$ 多样性指数研究的需要，通过多序列比对得到所有OTUs代表序列的系统发生关系，选取相对丰度排名前10的属所对应OTUs的系统发生关系数据，并结合每个OTUs的相对丰度及其代表序列的物种注释置信度信息进行整合展示<sup>[21-22]</sup>。这些属中的OTU之间的系统进化关系如图8所示。同属于拟杆菌门的普雷沃氏菌属 (*Prevotella*) 和拟杆菌属 (*Bacteroides*) 为人体肠道菌群中的优势菌属，而且在进化关系上较为接近，与前文中研究结果相同；其次，菌群丰度从大到小排列依次为萨特菌属 (*Sutterella*)、柔嫩梭菌属 (*Faecalibacterium*)、*Parabacteroides*、巨单胞菌属 (*Megamonas*)、小类杆菌属 (*Dialister*)、*Blautia* 菌属、毛螺菌属 (*Lachnospira*) 和*Phascolarctobacterium* 菌属。





不同的颜色对应不同的菌属，由内向外依次代表系统发育树、OTUs相对丰度和OTUs注释可信度。

图8 OTU的系统发育树

Fig. 8 Phylogenetic tree of all OTU

随后对OTU数据进行unweighted 和weighted UniFrac分析，生成相关的UniFrac距离矩阵。通过基于UniFrac的非加权组平均法（unweighted pair-group method with arithmetic mean, UPGMA）分析和基于OTU水平的无度量多维标定（non-metric multi-dimensional scaling, NMDS）分析<sup>[23]</sup>来分析微生态制剂对人体肠道菌群整体结构的影响。

UPGMA聚类结果如图9所示，左侧为聚类树，右侧为各样品在门水平上最大相对丰度排名前十物种的相对丰度分布图。NMDS结果如图10所示，其结果与UPGMA聚类结果相同。NMDS结果显示，不同受试人群样点群基本上分开，而同类志愿者样点基本聚在一起，很好地反映出各类人群肠道菌群结构差异的特点。从图中各样点群来看，失眠（I2）与健康（H1、H2）样点未交叠在一起，便秘（C1、C2）、大便异常（S1）、健康（H3）及腹泻（D1）样点的距离较接近，而口气异常（T1）和腹胀（A1）样点与其他样点分开距离较大且各自紧密成簇，微生态制剂干预后样点与干预前样点分开距离较小，且与其他样本点无任何交叠，原因可能是志愿者的肠道菌群结构相对稳定，受外界干预扰动较小；从各样点群内来看，各类人群菌群结构基本上是随着干预时间延长，与干预前差异增大，而停止干预后，样点又逐渐接近干预前的样点，虽然微生态制剂干预的过程中对肠道菌群结构有一定的调节作用，但干预停止后肠道菌群结构又恢复至干预前，可能是因为志愿者饮食结构、年龄或生活习惯对肠道菌群结构作用较大原因。说明相对短期的外源干预并不能使肠道菌群结构有较大改变。

其中较为特殊的是便秘（C1）样点，在微生态制剂干预前后在图中横轴方向上拉开较大距离，并逐渐靠向腹泻样点群，说明水苏糖对便秘志愿者的肠道菌群结构有着显著的调节作用，并有助于改善便秘的病理状况。

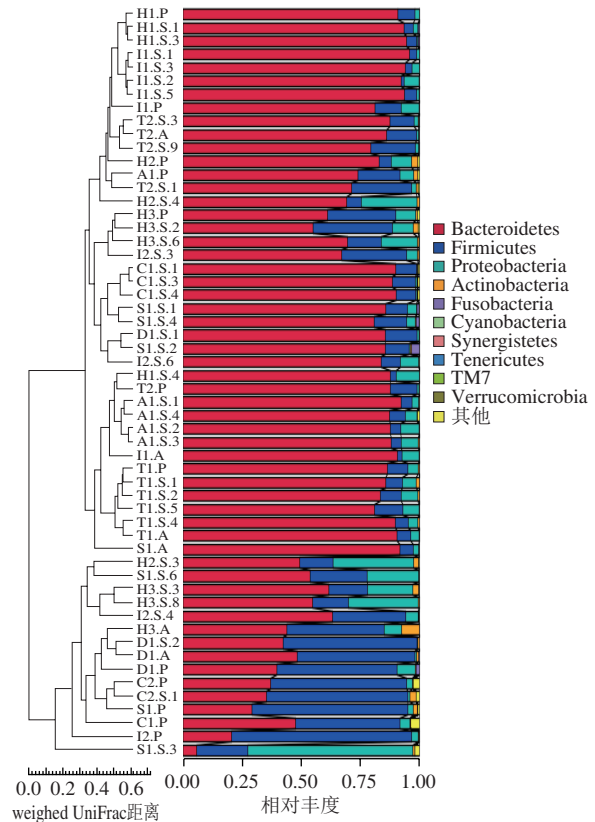


图9 基于weighted UniFrac距离的UPGMA聚类树

Fig. 9 UPGMA clustering tree based on the weighted Unifrac distance

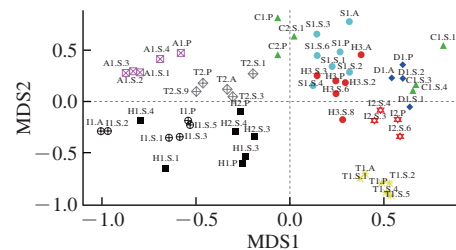


图10 志愿者肠道微生物样本的NMDS分析

Fig. 10 NMDS analysis of fecal microbial samples from volunteers

### 2.5.2 样本丰度聚类结果

如图11所示，所有样本中，除口气异常样本T1、腹胀样本A1中干预前后样本均单独聚在一起外，其余受试人群的样本均出现交叠，其中交叠跨度最大的为便秘样本，此结果与图10结果相似，说明微生态制剂对大部分样本肠道菌群结构产生了影响，尤其是对水苏糖干预下的便秘样本影响显著。

从图11可以看出，各样品的菌属存在明显的差异，差异明显的为普雷沃氏菌属 (*Prevotella*) 和拟杆菌属 (*Bacteroides*)，两菌属对应区域黄、蓝颜色差异明显，从横向（样本）来看，普雷沃氏菌属在左右两侧偏蓝，中间偏黄，而拟杆菌属在左右两侧偏黄，中间偏蓝，说明两者呈负相关关系，同时可以看出，聚类图根据这两种菌属的丰度将受试样本主要划分为分别以拟杆菌属和普雷沃氏菌属为核心菌属的两类，再次印证了肠道型的概念。

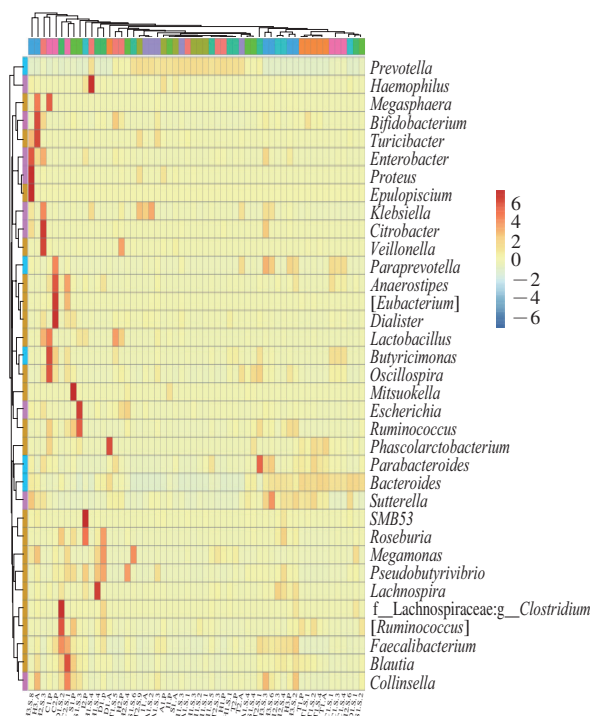


图 11 物种丰度聚类热图

Fig. 11 Heatmap showing the clustering of species abundance

物种丰度聚类热图中菌属丰度较高的菌属及其对应的样本，以及样本中胆固醇和胆汁酸含量变化情况如表2所示。可以看出在干预前，C1、C2、S1、I2、DI这些病理样本相对丰度较高的菌群不同，并且在干预中和干预后阶段这些菌群丰度大幅降低，说明微生态制剂的干预可能导致了这些菌群丰度的降低，并且这些菌群也可能是引起相应病理状况的特征菌。在干预中阶段，样本H1、C2、S1、H2、T1、T2、H3中有一些菌群丰度升高，在干预后阶段H3样本中也有相应菌群丰度增加，其中在MF-13干预下，外源益生菌*Parabacteroides*和*Bifidobacterium*相对丰度大幅增加。说明3种制剂具有调节肠道菌群的作用，其中MF-13对于增加肠道菌群中的有益菌有更显著的作用。

此外，结合胆汁酸和胆固醇含量变化来看，如在干预前，C1.P、C2.P、D1.P样本对应的粪便胆固醇和胆汁酸

水平均较低，但在干预后两者均有升高趋势，在干预中阶段，H1.S.4、S1.S.3、T2.S.1等样本对应的粪便胆固醇和胆汁酸水平有升高或者降低，而这些样本对应的丰度较高的菌属随后丰度降低，说明这些菌属可能是影响肠道脂质代谢的关键菌属，但其对粪便胆固醇和胆汁酸水平变化的影响规律不尽相同，并且这些较高丰度的菌属以及其对于肠道脂质代谢的具体作用机制和潜在临床意义还有待于进一步探索。

表 2 个体中丰度较高的肠道菌群

Table 2 Intestinal bacterial genera with high abundance in individuals

干预制剂	样品	相对丰度较高的菌属	粪便胆汁酸含量变化	粪便胆固醇含量变化
H1.S.4	C1.P	嗜血杆菌属 ( <i>Haemophilus</i> )	较干预前升高	较干预前升高
		乳杆菌属 ( <i>Lactobacillus</i> )、 <i>Butyrivomax</i> 、 <i>Oscillospira</i>	较低	较低
水苏糖	C2.P	<i>Anaerostipes</i> 、 <i>Eubacterium</i> 、 <i>Dialister</i> 、 <i>Paraprevotella</i>	较低	较低
		<i>Blautia</i>	较干预前升高	几乎无变化
S1.P	S1.S.3	光冈菌属 ( <i>Mitsuokella</i> )	较高	较高
		瘤胃球菌属 ( <i>Ruminococcus</i> )	较干预前降低	较干预前降低
H2.S.3	CPb	<i>柠檬酸杆菌 (Citrobacter)</i> 、 <i>韦荣氏球菌属 (Veillonella)</i>	较干预前降低	几乎无变化
		<i>罗斯氏菌属 (Roseburia)</i> 、 <i>SMB53</i>	较高	较低
D1.P	T1.S.5	<i>毛螺菌属 (Lachnospira)</i>	较低	较低
		<i>考拉杆菌属 (Phascolarctobacterium)</i>	几乎无变化	较前期降低
T2.S.1	MF-13	<i>Parabacteroides</i>	较干预前升高	较干预前升高
		<i>双歧杆菌属 (Bifidobacterium)</i> 、 <i>Turicibacter</i>	降低	升高
H3.S.8		<i>变形杆菌属 (Proteus)</i> 、 <i>Epulopiscium</i> 、 <i>肠杆菌属 (Enterobacter)</i>	较前期大幅升高	几乎无变化

## 2.6 Metastat统计学分析

经Metastat分析检测各组肠道菌群中具有明显差异的物种。从各干预组来看，样本在微生态制剂干预前后并无OTUs丰度的明显变化，因本研究中志愿者复杂、分组较多，且具有不同的肠型<sup>[18]</sup>，所以尝试从肠型入手，分析微生态制剂干预过程中同种肠型下各样本间肠道菌群中具有显著性差异的菌属。文献[24]展示了不同受试人群肠道菌群具有显著差异 ( $P < 0.05$ 、 $q < 0.05$ ， $q$ 值是 $P$ 值校正后的结果)的物种，与本研究中的差异物种一致。

分析以普雷沃氏属为核心菌属的样本H1、A1、I1、T2，以健康样本H1为参照，将样本A1、I1、T2分别与其进行两两对比经Metastat分析发现（表格未附上，下同），腹胀样本A1、失眠样本I1与H1之间在门、纲和目水平上没有差异显著的菌群，而样本A1中消化球菌科 (*Peptococcaceae*) 相对丰度高于样本H1，失眠样本I1与H1相比，*Barnesiellaceae*科和瘤胃球菌属 (*Ruminococcus*) 相对丰度较低，而*Butyrivomax*相对丰度较高；口气异常样本T2与H1相比，厚壁菌门 (*Firmicutes*) 及其门下的梭菌纲 (*Clostridia*)、梭菌目 (*Clostridiales*) 及毛螺菌科 (*Lachnospiraceae*) 相对丰度较高，并且T2中

变形菌门下的变形菌纲 (Deltaproteobacteria)、脱硫弧菌目 (Desulfovibrionales)、脱硫弧菌科 (Desulfovibrionaceae) 和嗜胆菌属 (*Bilophila*), 以及放线菌门下的Coriobacteriia纲相对丰度均显著高于样本H1。

分析以拟杆菌属为核心菌属的样本H3、C1、D1、S1、I2、T1, 以健康样本H3为参照, 进行两两对比, 经Metastat分析发现, 便秘样本C1中与健康样本H3菌群存在显著差异的为变形菌门及其门下的 $\beta$ -变形菌纲 (Betaproteobacteria)、伯克氏菌目 (Burkholderiales)、产碱杆菌科 (Alcaligenaceae) 以及萨特氏菌属 (*Sutterella*), 此外, 样本C1拟杆菌门下的普雷沃氏菌科 (Prevotellaceae)、[*Odoribacteraceae*]科、理研菌科 (Rikenellaceae) 及普雷沃氏菌属 (*Prevotella*)、[*Odoribacter*]相对丰度显著高于H3, 而萨特氏菌属 (*Sutterella*) 和光岗菌属 (*Mitsuokella*) 相对丰度较低; 大便异常样本S1中差异较显著的为 $\beta$ -变形菌纲及其下的产碱杆菌科及萨特氏菌属和拟杆菌门下的[*Paraprevotellaceae*]菌科及*Paraprevotella*菌属, 其相对丰度显著低于样本H3; 腹泻样本D1中差异显著的是变形菌门下的 $\beta$ -变形菌纲、伯克氏菌目 (Burkholderiales)、产碱杆菌科 (Alcaligenaceae) 和萨特氏菌属 (*Sutterella*), 以及厚壁菌门下的光岗菌属 (*Mitsuokella*) 和小类杆菌属 (*Dialister*), 其相对丰度较低; 失眠样本I2与H3差异显著的为光岗菌属 (*Mitsuokella*); 而口气异常样本T1与H3差异显著的菌群较多, 有4个菌门、4个菌纲、5个菌目、11个菌科、12个菌属差异显著, 主要是分布在拟杆菌门及其门下的纲、目、科、属相对丰度较高, 梭杆菌门和厚壁菌门及其门下所属物种、变形菌门、放线菌门下所属物种相对丰度较低, 此结果与NMDS分析结果相似 (样本T1在NMDS图上与其他样本点距离分开较大)。

### 3 讨论

从整体上看, 本研究通过对微生态制剂干预后不同疾病人群肠道微生物 $\alpha$ 多样性分析发现, 在水苏糖和CPb干预组中呈波动甚至有降低趋势, 但干预前后无明显性差异; 而MF-13对样本内物种丰度及多样性的提高有促进作用, 其原因可能是MF-13含有的益生菌和益生元共同促进了肠道内相关菌群的增殖, 并且其促进作用较单独的益生元或益生菌更明显, 说明合生元MF-13能够在一定程度上改善宿主肠道微生物的多样性和物种丰度。李艳艳等探讨不同组合的合生元对CCl<sub>4</sub>所致急性化学性肝损伤小鼠的肝脏保护作用, 结果显示, 与空白对照组比较, 模型组小鼠拟杆菌门和变形菌门相对丰度升高, 而厚壁菌门相对丰度降低<sup>[25]</sup>。此外, 在干预过程中由于

未对外界因素 (如饮食和作息习惯等) 进行控制, 且各干预组中存在个体间生理状态的差异, 这些因素可能对肠道微生物多样性产生较大干扰, 但实验结果显示, 微生态制剂对肠道微生物多样性并无明显变化, 提示在多种外界因素存在情况下, 微生态制剂可能在一定程度上抵御了外界因素对肠道微生物多样性的干扰, 维持了肠道微生态的平衡。

本研究对各类志愿者所有样本在门水平和属水平上的相对丰度变化进行分析, 在门水平上占优势的为拟杆菌门和厚壁菌门, 各干预组门水平相对丰度变化结果显示, 水苏糖对两大优势菌门相对丰度影响趋势较明显, 其能促进拟杆菌门而抑制厚壁菌门菌群的增殖; CPb对各菌门的丰度变化无显著影响; 而MF-13对变形菌门和放线菌门相对丰度影响较明显, 两者均呈增长趋势。结果表明, 水苏糖作为一种增殖因子, 可能促进了肠道内某些菌群的增殖, 间接抑制了另一些菌群的增殖, 而较集中地表现在拟杆菌门菌群相对丰度增长和厚壁菌门相对丰度的降低。许多研究显示, 肥胖者肠道内两者的比例往往低于健康者。提示水苏糖有维持机体健康的潜在益生作用。CPb对各菌门的丰度变化无明显影响, 可能与外界干扰因素或干预周期长短相关。而MF-13同时含有益生菌与益生元, 能使其含有的外源益生菌更好地定植于肠道内, 从而促进放线菌门的增殖, 但结果显示同时伴随有变形菌门的增殖, 其可能的原因是肠道各菌群之间复杂的共生及竞争关系所致。从菌属水平上的分析发现, 志愿者被划分为拟杆菌属肠型和普雷沃氏菌属两种肠型, 这与Wu等<sup>[17]</sup>的研究结果相似。从微生态制剂对肠型的影响来看, 除个别样本外, 3种微生态制剂对于肠型即核心菌属的改变几乎无影响, 说明相较于短期的微生态制剂干预, 长期固定的膳食结构对肠道菌群结构的形成及稳定有着深远的影响。岳文秀等<sup>[26]</sup>的研究结果显示, 红葡萄酒花色苷可促进肠道益生菌生长, 抑制部分有害菌增殖, 可调节肠道菌群结构和功能、提高人体肠道新陈代谢能力, 但未说明停止干预时, 肠道菌群结构的变化情况。微生态制剂干预后, 个别样本中核心菌属变化较大, 但随着干预时间延长, 核心菌属逐渐稳定, 原因可能是志愿者本身处于的病理状态的影响或者是初期取样不均造成。另外, 3种微生态制剂均能普遍提高普雷沃氏菌属和拟杆菌属的相对丰度, 对于病理样本菌群的影响主要表现为提高有益菌相对丰度而降低有害菌的丰度。

在NMDS分析和聚类分析中, 微生态制剂干预过程中大部分志愿者肠道菌群结构出现交叠, 而停止干预后, 又接近于干预前状态, 说明微生态制剂对肠道菌群结构的改变有一定的影响, 但并不能产生持续性的影响, 同时揭示肠道微生态一直处于动态平衡, 外在干扰因素消失后, 又恢复到干扰前状态。但对于病理样本,



如便秘和腹泻样本干预前后相比肠道菌群结构变化较大,在停止干预后并未出现恢复至干预前状态,表明微生态制剂可能对于失调的肠道菌群有着明显的调节作用和益生作用。本研究还对同种肠型人群下个体间菌群差异进行了Metastat分析,将各类疾病人群与健康人群对比,意在找到存在显著差异的菌群。分析发现即使在同种肠型下比较,个体之间存在的差异仍较大,其结果与NMDS及聚类分析结果相似,与健康人群存在差异菌群越多,在NMDS及聚类图上相应的距离也越远。

总之,因各干预组样本量及受试个体差异较大,本实验未能找出各微生态制剂在干预前后肠道菌群结构明确的变化规律,但通过干预前后的比较发现,3种微生态制剂对肠道菌群结构,特别是对于病理状态下个体的肠道菌群有一定的调节作用,并使其趋向于健康状态。

胆固醇是人体必需的营养成分,而胆汁酸有助于肠道中膳食脂肪和脂溶性维生素的吸收<sup>[27]</sup>,胆固醇在肝脏中经一系列酶促反应转换胆汁酸,两者的代谢密切相关,在肝肠循环中互相调控,以维持机体代谢平衡,其中,肠道内菌群对胆汁酸和胆固醇的代谢发挥着重要作用。许多研究显示,益生菌如乳酸杆菌、双歧杆菌以及粪球菌等能够促进肠道内胆汁酸的排出,减少胆汁酸的肝肠循环,同时促进胆固醇转变为胆汁酸,如此,益生菌在降低机体胆汁酸的同时能够降低血液中胆固醇水平,而两者在粪便中的含量有所增加。

本研究结果显示,水苏糖和CPb对粪便中胆汁酸和胆固醇含量变化趋势的影响不明显,胆汁酸和胆固醇水平在水苏糖和CPb组表现出此消彼长的关系,可能是胆汁酸和胆固醇的肝肠循环和胆固醇的回补作用所致;而在MF-13干预组中,胆汁酸和胆固醇水平变化趋势呈现正相关,MF-13对粪便中胆汁酸和胆固醇的排放有促进作用,且整体上均在干预阶段3~8周时作用显著( $P<0.05$ ),但在干预停止后粪便中胆汁酸和胆固醇含量均回落至干预前水平。一方面,MF-13在促进肠道中胆汁酸排出的同时也能促进胆固醇的排出,说明MF-13除了能对胆汁酸的肝肠循环产生影响外,还有可能是其所含有的某些益生菌及其引起的肠道中某些变化的菌属,通过某些降胆固醇机制来促进机体胆固醇的排出;另一方面,3种微生态制剂在停止干预后,对粪便胆汁酸和胆固醇水平不再产生影响,此结果与肠道菌群在门、属水平丰度和菌群结构的变化结果相类似,表明相对短期的干预不能产生持续性的影响,提示相对短期内,益生菌在肠道内的定植或其所引起的相关菌属的变化是不稳定的。

#### 4 结论

本实验通过微生态制剂干预不同肠道疾病人群,

利用二代测序结合生物信息学的分析方法进行研究,发现3种益生菌制剂均会对肠道菌群的多样性和结构造成影响。在门水平上,水苏糖能促进拟杆菌门而抑制厚壁菌门菌群的增殖;CPb对拟杆菌门和厚壁菌门菌群相对丰度的影响不明显,在整个干预过程中各菌门的丰度变化呈现波动;益生元MF-13对拟杆菌门和厚壁菌门相对丰度无明显影响,而对变形菌门和放线菌门菌群的增殖有促进作用。在属水平上,水苏糖能明显降低便秘和失眠样本中变形菌门下的萨特菌属的丰度,CPb对降低腹泻样本中萨特菌属以及升高柔嫩梭菌属的丰度有明显作用,MF-13能够提高样本中Parabacteroides的丰度。在肠道菌群结构上,大部分样本在微生态制剂干预过程中菌群结构都产生变化,并有群体间相互交叠的趋势,而干预停止后又趋于干预前状态。说明短期的微生态制剂干预相较于长期的饮食结构、环境和生活习惯等,对肠道菌群结构的纠正是暂时性而非持久性的,且从肠型的改变上来看,其纠正的强度也相对较弱。

另外,通过对各类人群粪便样本中胆固醇和胆汁酸含量的测定,发现在3种微生态制剂干预过程中,水苏糖和CPb对志愿者粪便胆汁酸和胆固醇含量变化趋势整体不明显,而MF-13对肠道胆汁酸和胆固醇的排出整体上有显著的促进作用( $P<0.05$ ),但干预的持续性不明显,表明MF-13有利于改善胆固醇的代谢,在干预过程中对维持机体健康状态具有积极作用。

#### 参考文献:

- [1] ARAYA M, MORELLI L, REID G, et al. Guideline for the evaluation of probiotics in food[R]. Food and Agriculture Organization/World Health Organization, 2002.
- [2] 孙雯娟,张波,李大魁,等. 益生菌制剂的发展现状与临床应用进展[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(9): 850-857. DOI:10.13286/j.cnki.chinhosp-pharmacy.2015.09.22.
- [3] 郑智俊,黄云,秦楠. 人体肠道宏基因组生物信息分析方法[J]. 微生物学报, 2018, 58(11): 2020-2032. DOI:10.13343/j.cnki.wsxb.20180110.
- [4] DORÉ J, CORTIER G. The human intestinal microbiota[J]. Gastroentérologie Clinique et Biologique, 2010, 34(1): 7-15. DOI:10.1016/S0399-8320(10)70015-4.
- [5] 叶雷,阎亚丽,陈庆森,等. 高通量测序技术在肠道微生物宏基因组学研究的进展[J]. 中国食品学报, 2016, 16(7): 216-223. DOI:10.16429/j.1009-7848.2016.07.029.
- [6] WANG Fang, YU Ting, HUANG Guohong, et al. Gut microbiota community and its assembly associated with age and diet in Chinese centenarians[J]. Journal of Microbiology & Biotechnology, 2015, 25(8): 1195. DOI:10.4014/jmb.1410.10014.
- [7] BÄCKHED F, LEY R E, SONNENBURG J L, et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine[J]. Science, 2005, 307: 1915-1920. DOI:10.1126/science.1104816.
- [8] GERRITSEN J, SMIDT H, RIJKERS G T, et al. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics[J]. Genes & Nutrition, 2011, 6(3): 209-240. DOI:10.1007/s12263-011-0229-7.
- [9] SASSONE-CORSI M, NUCCIO S P, LIU H, et al. Microcins mediate competition among Enterobacteriaceae in the inflamed gut[J]. Nature, 2016, 540: 280-283. DOI:10.1038/nature20557.

- [10] HARIHARAN R, ODJIDJA EN, SCOTT D, et al. The dietary inflammatory index, obesity, type 2 diabetes, and cardiovascular risk factors and diseases[J]. *Obesity Reviews*, 2022, 23(1): e13349. DOI:10.1111/obr.13349.
- [11] JAYASIMHAN S, YAP N Y, ROEST Y, et al. Efficacy of microbial cell preparation in improving chronic constipation: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial[J]. *Clinical Nutrition*, 2013, 32(6): 928-934. DOI:10.1016/j.clnu.2013.03.004.
- [12] 臧凯丽, 江岩, 孙勇, 等. 微生态制剂调节便秘、腹泻人群肠道菌群结构与产短链脂肪酸关键菌属的相关性[J]. *食品科学*, 2018, 39(5): 155-165. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201805024.
- [13] KIM M, SHIN H K. The water soluble extract of chicory influences serum and liver lipid concentrations, cecal short-chain fatty acid concentrations and fecal lipid excretion in rats[J]. *Nature*, 1998, 128: 1731-1736. DOI:10.1093/jn/128.10.1731.
- [14] 李瑞, 侯改凤, 刘明, 等. 德氏乳杆菌对育肥猪生产性能、血脂指标及粪和组织中总胆固醇和总胆汁酸含量的影响[J]. *动物营养学报*, 2015, 27(1): 247-255. DOI:10.3969/j.issn.1006-267x.2015.01.030.
- [15] TURNBAUGH P J, HAMADY M, YATSUNENKO T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins[J]. *Nature*, 2009, 457: 480-484. DOI:10.1038/nature07540.
- [16] NOOR S O, RIDGWAY K, SCOVELL L, et al. Ulcerative colitis and irritable bowel patients exhibit distinct abnormalities of the gut microbiota[J]. *BMC Gastroenterology*, 2010, 10(1): 134. DOI:10.1186/1471-230X-10-134.
- [17] WU G D, CHEN J, HOFFMANN C, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes[J]. *Science*, 2011, 334: 105-108. DOI:10.1126/Science.1208344.
- [18] MANIMOZHIYAN A, JEROEN R, ERIC P, et al. Enterotypes of the human gut microbiome[J]. *Nature*, 2011, 473: 174-180. DOI:10.1038/nature09944.
- [19] ROSÁRIO R, DUONG T V, FRONTEIRA I. Dietary intake, eating behavior and health outcomes[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2023, 10: 1158970. DOI:10.3389/FNUT.2023.1158970.
- [20] GERRITSEN J, SMIDT H, RIJKERS G T, et al. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics[J]. *Genes & Nutrition*, 2011, 6(3): 209-240. DOI:10.1007/s12263-011-0229-7.
- [21] 陈燕飞. 肝硬化患者肠道微生态研究: 从结构到功能[D]. 杭州: 浙江大学, 2013: 40-43.
- [22] 庄汇川. 阴极材料对微生物燃料电池性能与微生物群落结构的影响[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2015: 60-66.
- [23] RIVAS M N, BURTON O T, WISE P, et al. A microbiota signature associated with experimental food allergy promotes allergic sensitization and anaphylaxis[J]. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2013, 131(1): 201-212. DOI:10.1016/j.jaci.2012.10.026.
- [24] 贾彦. 微生态制剂调整人体肠道菌群结构紊乱能力及对脂代谢影响的研究[D]. 天津: 天津商业大学, 2018: 1-43.
- [25] 李艳艳, 丁红, 刘承尧, 等. 合生元对CCl<sub>4</sub>诱发小鼠急性化学性肝损伤的改善作用及其机制[J]. *山东医药*, 2023, 63(11): 37-42.
- [26] 岳文秀, 吴璐璐, 韩富亮. 葡萄酒干物质和花色苷对人体肠道菌群的影响: 基于体外模拟发酵法[J]. *食品科学*, 2022, 43(11): 121-129. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20210506-044.
- [27] PALMEIRA C M, ROLO A P. Mitochondrially mediated toxicity of bile acids[J]. *Toxicology*, 2004, 203: 1-15. DOI:10.1016/J.TOX.2004.06.001.