

李在建,王怀山,赵京杨,等.芽孢杆菌对肥胖大鼠肠道微生态的影响[J].江苏农业科学,2017,45(18):162-165.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.18.041

芽孢杆菌对肥胖大鼠肠道微生态的影响

李在建^{1,2},王怀山²,赵京杨²,操继跃²

(1.聊城大学农学院,山东聊城 252000; 2.华中农业大学动物医学院,湖北武汉 430070)

摘要:给大鼠饲喂高脂日粮,建立大鼠肥胖模型,以研究肥胖对肠道微生态的影响。给肥胖大鼠灌胃芽孢杆菌悬液,分别在芽孢杆菌处理试验的第4周、第7周采样,研究灌喂芽孢杆菌后肥胖大鼠肠道菌群结构的变化,以及芽孢杆菌对粪便中短链脂肪酸和大鼠体质量的影响。结果表明,芽孢杆菌能够显著提高其肠道菌群的多样性,并且对肥胖动物的体质量控制起到一定的积极作用。

关键词:肥胖;大鼠;肥胖抵抗;芽孢杆菌;肠道微生态

中图分类号: S852.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)18-0162-04

近年来,肥胖人群的数量越来越大,肥胖及由其引起的一系列疾病已经严重影响到人类的生活质量。尽管有研究证明,某种类型的肥胖可能和机体的基因突变有关,但是人类的基因在短时期内很难发生特别大的改变,所以现在研究专家已经将研究的注意力转移到可能导致肥胖的外界因素上^[1-2]。有“人类第二基因”之称的肠道微生物目前已经成为研究热点,有研究表明,肠道微生物可以提高宿主从食物中摄取能量的效率并且能对脂肪代谢起调控作用,最终导致肥胖的产生^[3]。所以,如何通过外界因素影响机体的肠道微生态进而达到控制肥胖的目的已经成为国际关注的焦点。益生菌作为肠道益生产品对肠道微生态的影响较大,它能明显改变肠道的菌群结构,因此,通过益生菌调节肠道微生态来观察其对肥胖的影响就成为了一个比较热门的研究方向^[4-5]。

本试验首先建立大鼠肥胖模型研究肥胖与肠道微生态之间的关联,然后通过给肥胖大鼠灌喂芽孢杆菌悬液,研究芽孢杆菌对肥胖大鼠肠道微生态、肠道微生物代谢产物(短链脂肪酸)及其体质量的影响,为研究芽孢杆菌对肥胖动物的益生作用提供新的依据,对如何通过外源性益生物质调节肥胖动物的肠道微生态进而对肥胖的影响有重要的研究意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

50只健康SD雄性大鼠,体质量100~200g,无特定病原体(SPF)等级,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供;芽孢杆菌,由华中农业大学生理实验室保存;基础日粮,由同济医科大学实验动物中心提供;高脂日粮,由60%基础饲料、15%猪油、10%蛋黄粉、8%脱脂奶粉、5%干酪素、2%白砂糖组成。

1.2 主要试剂与设备

Tris 饱和酚,北京鼎国昌盛生物科技有限责任公司生产; marker,北京鼎国生物技术有限公司生产;扩增所用引物,生工生物工程(上海)股份有限公司生产;色谱标准酸,上海化学试剂有限公司试剂一厂生产;高速低温离心机, Eppendorf 公司生产;水浴锅,常州国华电器有限公司生产;电热恒温培养箱,上海博远实业有限公司生产;PCR仪,广东东盛生物科技有限公司生产;变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)系统(D-Code), Bio-Rad 公司生产;气相色谱仪(Trace-GC2000),美国热电集团生产。

1.3 试验方法

1.3.1 试验动物处理 50只大鼠于同济医科大学动物实验中心饲养,肥胖模型建立期间把大鼠随机分成2个组:阴性对照组(20只,饲喂基础日粮)、模型组(30只,饲喂高脂日粮)。各组自由饮水、采食。以饲喂高脂日粮组大鼠体质量达到正常大鼠体质量120%以上为肥胖模型建立成功标准^[6]。肥胖模型建立成功后进入芽孢杆菌灌喂期,进入灌喂期再将阴性对照组分出10只大鼠作为阴性芽孢杆菌组,将模型组分为

收稿日期:2016-04-14

基金项目:聊城大学博士启动基金(编号:318051314)。

作者简介:李在建(1986—),男,山东青州人,博士,讲师,主要从事兽医药理学与生物制品学研究。Tel: (0635) 8239936; E-mail: lizj8603@163.com。

通信作者:王怀山,男,硕士,兽医师,主要从事动物微生态制剂方面的研究。E-mail: wanghuaishan@163.com。

率的影响[J].水生生物学报,2005,29(4):449-455.

[14]黄瑾.小新月菱形藻的无机碳利用机制及其碳酸酐酶的环境调控[D].汕头:汕头大学,2008.

[15]Nielsen E S. Uptake of CO₂ by the plant[M]. Berlin-Heidelberg: Springer, 1960.

[16]Mudimu O, Rybalka N, Bauersachs T, et al. Influence of different CO₂ concentrations on microalgae growth, α-tocopherol content and

fatty acid composition[J]. Geomicrobiology Journal, 2015, 32(3/4):291-303.

[17]Razzak S A, Ilyas M, Ali S A, et al. Effects of CO₂ concentration and pH on mixotrophic growth of *nannochloropsis oculata* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 176(5):1290-1302.

[18]杨熙,向文洲,张峰,等.产油嗜碱绿球藻MC-1的烟气适应性[J].生物工程学报,2013,29(3):370-381.

3 组:10 只肥胖模型组、10 只肥胖芽孢杆菌组、10 只肥胖抵抗组(饲喂奥利司他)。阴性芽孢杆菌组和肥胖芽孢杆菌组在灌喂期间的灌喂量为每次灌喂芽孢杆菌菌悬液 1 mL/只(1×10^7 CFU/mL),每天灌喂 1 次,持续 45 d。其他各组按相同时间和相同剂量灌喂蒸馏水。

1.3.2 采样 在肥胖模型建立前首先采集 1 次大鼠的粪便,此后每周采集 1 次各组大鼠的粪便,所有样品立即在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存备用。

1.3.3 ERIC-PCR 分析 参照 Gordon 等的报道^[7],引物序列为 ERIC-1:5'-ATGTAAGCTCCTGGG GATTAC-3',ERIC-2:5'-AAGTAAGTGA CTGGGTGAGCG-3',细菌基因组重复序列 PCR 技术(ERIC-PCR)扩增体系如表 1 所示。

表 1 ERIC-PCR 扩增体系

体系成分	浓度	体积(μL)
10×buffer		2.5
Mg ²⁺	25 mmol/L	2
dNTP	2.5 mmol/L	2
ERIC-1	10 $\mu\text{mol/L}$	1
ERIC-2	10 $\mu\text{mol/L}$	1
Taq 酶	5 U/ μL	0.5
ddH ₂ O		15
DNA 模板	20 ng/ μL	1
总体积		25

反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 7 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,52 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,65 $^{\circ}\text{C}$ 8 min,30 个循环;65 $^{\circ}\text{C}$ 16 min。取 1 μL PCR 扩增产物测定浓度。然后使用 1.5% 琼脂糖凝胶在 180 V 电压下电泳约 50 min 得到相应的图谱,每个样品的上样量约为 400 ng。最后使用凝胶成像系统对凝胶进行拍照。

1.3.4 粪便中短链脂肪酸(SCFA)的测定 准确称取 0.5 g 粪便样品于 7 mL 离心管中,然后加入 0.5 mL 纯水,涡旋混匀 3 min,15 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min,取 0.5 mL 上清液于另一离心管中,加入 100 μL 25% 偏磷酸,混匀 3 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜,取出后 15 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min,取上清液稀释 100 倍后供气相色谱分析^[8]。

1.4 数据处理与分析

利用 Quantity One[®] v4.4 软件将试验所得凝胶上的条带进行非加权平均距离(UPGMA)聚类分析、相似度分析等。试验所得数据采用 SPSS 11.0 进行统计分析,数据均采用“平均数±标准误差”表示。

2 结果与分析

2.1 肥胖模型建立结果

由表 2 可知,与肥胖模型组相比各组大鼠体质量均差异极显著($P<0.01$)。

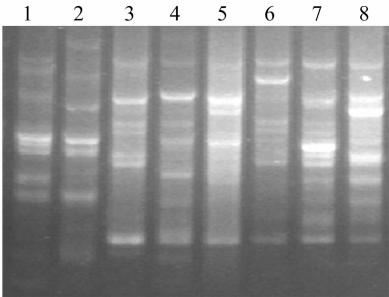
表 2 各处理对大鼠体质量的影响

处理	体质量(g)
肥胖模型组	519.38±23.06
阴性对照组	453.63±33.11**
阴性芽孢杆菌组	441.50±21.59**
肥胖芽孢杆菌组	503.25±9.84**
肥胖抵抗组	441.13±11.78**

注:“**”表示与肥胖模型组相比差异极显著($P<0.01$)。

2.2 ERIC-PCR 结果

2.2.1 肥胖大鼠肠道微生物的 ERIC-PCR 结果 由图 1 可知,建模前、后阴性对照组的主条带并无明显差异,许多明亮的主条带属于 2 组共有,但是肥胖模型组的主条带却发生了比较大的变化,多条原本灰暗的条带在建模成功后变成了明亮的主条带,并且在建模前、后模型组条带的多样性明显增多。这说明,肥胖对肠杆菌的影响比较明显,不但可以增高其多样性,还能增加其数量。

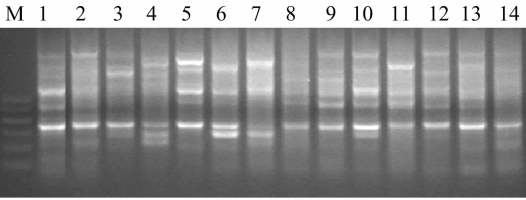


1~2—建模前阴性对照组和肥胖模型组;3~5—建模后阴性对照组;6~8—建模后肥胖模型组

图1 肥胖模型建立期间大鼠粪便样品的 ERIC-PCR 电泳图谱

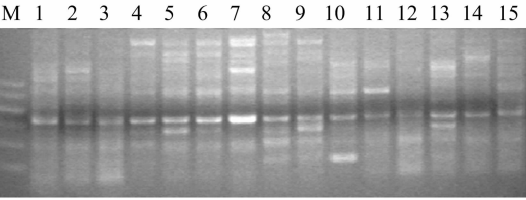
2.2.2 各处理对大鼠肠道微生态影响的 ERIC-PCR 结果

由图 2 可知,在芽孢杆菌处理第 4 周时(图 2-a),各组条带的多样性较高,有些明亮的条带所有组均具备,但是不同组之间的优势条带存在差异。肥胖模型组和肥胖芽孢杆菌组无论从条带的数目还是条带的亮度上都要优于其他各组。与阴性对照组相比,肥胖抵抗组明亮条带的数目明显较少。在芽孢杆菌处理第 7 周时(图 2-b),阴性对照组和肥胖芽孢杆菌组的条带比较集中,明亮的条带较多,肥胖鼠经芽孢杆菌处理后,其条带的多样性增加。而肥胖抵抗组条带的数目明显下降,亮条带也基本消失。这说明,芽孢杆菌对肥胖大鼠肠杆菌菌群的影响是比较明显的,它能增加其肠杆菌的多样性和数



M—marker; 1~2—肥胖抵抗组;3~5—阴性对照组;6~8—阴性芽孢杆菌组;9~11—肥胖芽孢杆菌组;12~14—肥胖模型组

a.芽孢杆菌处理第 4 周大鼠粪便样品的 ERIC-PCR 电泳图谱



M—marker; 1~3—肥胖抵抗组;4~6—肥胖模型组;7~9—肥胖芽孢杆菌组;10~12—阴性对照组;13~15—阴性芽孢杆菌组

b.芽孢杆菌处理第 7 周大鼠粪便样品的 ERIC-PCR 电泳图谱

图2 大鼠粪便样品的 ERIC-PCR 电泳图

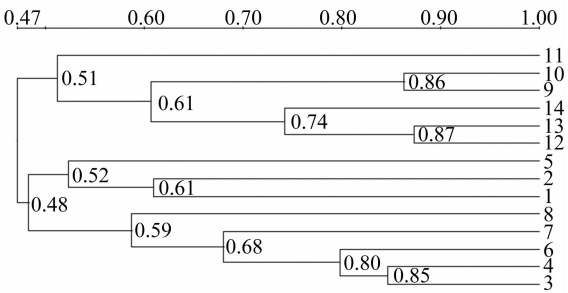
量。在这 2 个时间点,肥胖抵抗组大鼠肠杆菌的多样性和数量均低于肥胖模型组大鼠。

由图 3 可知,在芽孢杆菌处理第 4 周时(图 3-a),阴性对照组和肥胖芽孢杆菌组大鼠之间的肠杆菌菌群已经开始出现轻微的差异性。肥胖抵抗组跟阴性对照组相比也表现出一定的差异性,但不是十分明显。在芽孢杆菌处理第 7 周时(图 3-b),肥胖抵抗组和肥胖芽孢杆菌组之间存在一定的差异。阴性对照组和肥胖芽孢杆菌组也表现出比较明显的差异。上述结果表明,肥胖大鼠肠杆菌的菌群结构受芽孢杆菌的影响比较大,到第 7 周时,其菌群结构发生的改变已经非常明显。而肥胖抵抗大鼠肠杆菌的菌群结构与肥胖鼠相比差异性随时间变化逐渐增大。

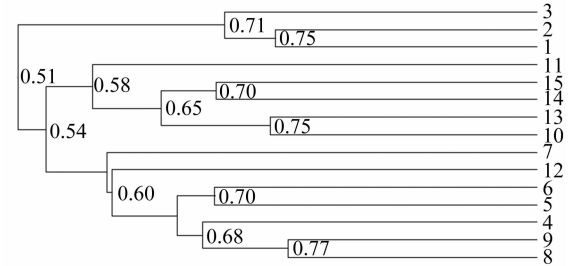
2.3 大鼠粪便中 SCFA 的测定结果

2.3.1 大鼠粪便中 SCFA 的色谱图分析结果 由图 4 可知,与标准品的色谱图相比,各试验组样品色谱图的各个峰之间没有叠加,分离良好。

2.3.2 试验处理对大鼠粪便中 SCFA 的影响及其分析 由表 3 可知,阴性对照组粪便中总 SCFA 的含量为 $(19.50 \pm 1.96) \mu\text{g/mL}$,其中乙酸的含量最多,丙酸、丁酸的含量次之;肥胖模型组粪便中 SCFA 含量为 $(25.33 \pm 1.99) \mu\text{g/mL}$,显著高于阴性对照组 ($P < 0.05$),其中乙酸的含量为 $(20.52 \pm 1.83) \mu\text{g/mL}$,显著高于阴性对照组乙酸的含量 ($P < 0.05$);另外,与肥胖模型组相比,肥胖抵抗组样品粪便中 SCFA 总量和乙酸的含量均差异极显著 ($P < 0.01$),丙酸的含量显著降低 ($P < 0.05$),而丁酸的含量略有升高;肥胖大鼠在芽孢杆菌作用下其粪便中 SCFA 的总含量、乙酸、丁酸的含量均有不同程度的升高,但变化不显著。这些试验结果间接反映出大鼠



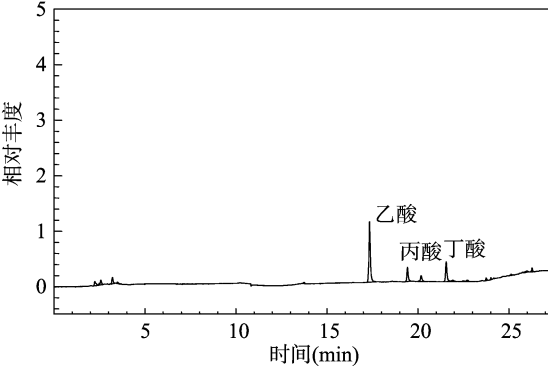
1~2—肥胖抵抗组; 3~5—阴性对照组; 6~8—阴性芽孢杆菌组; 9~11—肥胖芽孢杆菌组; 12~14—肥胖模型组
a.芽孢杆菌处理第 4 周各样品条带的 UPGMA 聚类分析结果



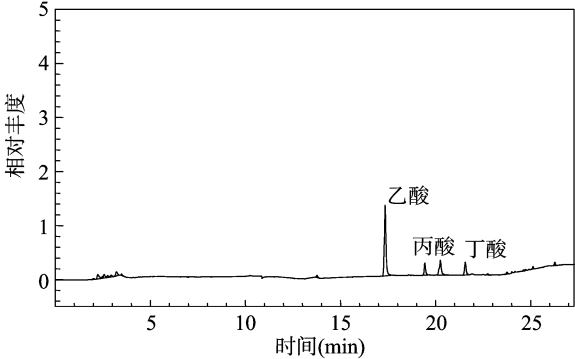
1~3—肥胖抵抗组; 4~6—肥胖模型组; 7~9—肥胖芽孢杆菌组; 10~12—阴性对照组; 13~15—阴性芽孢杆菌组
b.芽孢杆菌处理第 7 周各样品条带的 UPGMA 聚类分析结果

图3 UPGMA 聚类分析结果

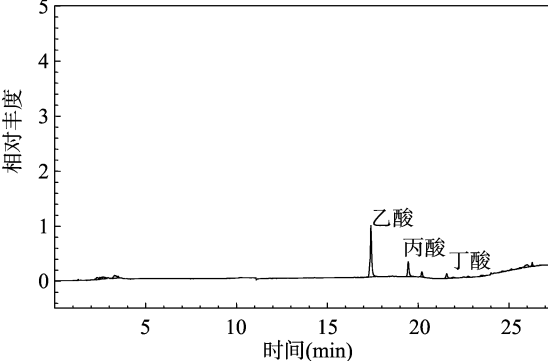
肠道厌氧菌菌群的变化情况,大鼠肥胖后其肠道厌氧菌菌群的结构变化明显,可能是总菌量增加或菌的活性增高;芽孢杆菌可以改善肥胖大鼠肠道厌氧菌的菌群结构,但是这种作用



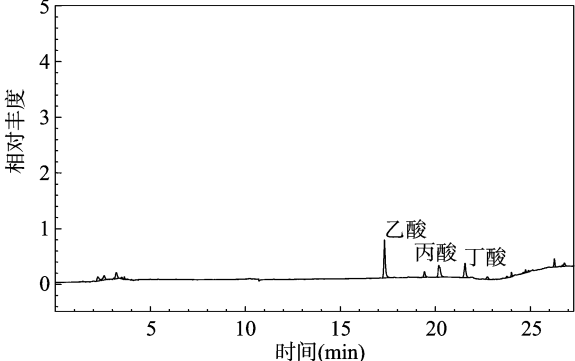
a.肥胖模型组样品中短链脂肪酸的色谱分析结果



b.肥胖芽孢杆菌组样品中短链脂肪酸的色谱分析结果



c.阴性芽孢杆菌组样品中短链脂肪酸的色谱分析结果



d.肥胖抵抗组样品中短链脂肪酸的色谱分析结果

图4 大鼠粪便样品中短链脂肪酸的色谱分析结果

表 3 各处理对大鼠粪便中短链脂肪酸的影响

处理	含量(μg/mL)			
	总 SCFA	乙酸	丙酸	丁酸
阴性对照组	19.50 ± 1.96Ab	15.69 ± 1.68Ab	2.28 ± 0.49Aa	1.53 ± 0.27Ab
肥胖模型组	25.33 ± 1.99Aa	20.52 ± 1.83Aa	2.75 ± 0.64Aa	2.06 ± 0.52Aa
肥胖芽孢杆菌组	27.68 ± 2.01Aa	22.26 ± 1.90Aa	2.72 ± 0.61Aa	2.70 ± 0.57Aa
阴性芽孢杆菌组	21.04 ± 1.88Ab	17.18 ± 1.33Ab	3.06 ± 0.89Aa	0.80 ± 0.14Bb
肥胖抵抗组	14.98 ± 1.39Bc	11.31 ± 1.76Bc	1.32 ± 0.21bAb	2.35 ± 0.54Aa

注:同列数据不同大、小写字母表示在 0.01、0.05 水平上差异显著。

不明显。另外,与肥胖模型组大鼠相比,肥胖抵抗组大鼠肠道厌氧菌的数量或活性都明显偏低,说明两者肠道厌氧菌菌群的结构差异性较大。

4 讨论

本试验结果表明,芽孢杆菌不仅可以改变肥胖大鼠肠道微生物数量,还能够影响菌群的种类。芽孢杆菌能够增加肠道菌群结构的多样性,这种调节作用的直接后果就是降低了肥胖大鼠的体质量,数据显示,给肥胖大鼠饲喂适量的芽孢杆菌 4 周后,其体质量明显下降。这说明外源性芽孢杆菌能够改变肥胖大鼠的肠道菌群结构,增高其菌群多样性并能增加菌群的数量,通过这种对肠道微生态的调节作用,可以达到控制其肥胖体质量的目的^[9-10]。进一步说明,外源性芽孢杆菌和肥胖大鼠内源性肠道菌相互作用可以给肥胖大鼠肠道微生物的能量代谢带来较大的影响,进而影响体内脂肪的堆积程度,最终改变了肥胖大鼠的体质量。

肥胖模型组大鼠粪便中各种 SCFA 的含量均明显高于阴性对照组,说明在肥胖的形成过程中其粪便中 SCFA 的含量逐渐升高;肥胖抵抗组大鼠粪便中各种 SCFA 的含量明显低于肥胖模型组大鼠,说明动物的肥胖程度与其粪便中短链脂肪酸含量之间呈现一种正相关的关系。这从侧面反映出肥胖可能改变了肠道厌氧菌群的结构,增加了厌氧菌的数量或增强了厌氧菌的活性,从而使厌氧菌的代谢产物 SCFA 含量随之增加。其原因可能是高脂饮食的摄入改变了肠道内厌氧菌的发酵底物,而这种发酵底物正好适合厌氧菌的生活特性,因此,该发酵产物可能刺激厌氧菌增加了其发酵活性,也有可能增加了厌氧菌的总量^[11-12]。

肥胖与肠道微生态之间有直接的联系,动物肥胖后肠道菌群结构会发生较大的变化,并有新的优势菌群产生,至于该优势菌群的种属还有待于做进一步的鉴定;芽孢杆菌能改变肥胖动物的肠道菌群结构,明显提高其菌群多样性,通过这种调节作用能够对肥胖动物的体质量控制起到一定的积极影响^[13]。

参考文献:

[1] Backhed F, Ley R E, Sonnenburg J L, et al. Host - bacterial

mutualism in the human intestine[J]. Science,2005,307(5717): 1915 - 1920.

[2] Gill S R, Pop M, Deboy R T, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome [J]. Science, 2006, 312 (5778): 1355 - 1359.

[3] 张桂兰,程薇莉,毕洪玲,等. 老年性便秘肠道菌群的微生物学研究[J]. 中国微生物学杂志,2003,15(5):299 - 299,301.

[4] Spindler - Vesel A, Bengmark S, Vovk I, et al. Synbiotics, prebiotics, glutamine, or peptide in early enteral nutrition: a randomized study in trauma patients [J]. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, 2007,31(2):119 - 126.

[5] Guarner F. Inulin and oligofructose: impact on intestinal diseases and disorders[J]. The British Journal of Nutrition,2005,93(S1):61 - 65.

[6] 许榕仙. 肥胖的病因与防治[J]. 海峡预防医学杂志,2002,8(5):31 - 33.

[7] Gordon J H, Dubos R. The anaerobic bacterial flora of the mouse cecum[J]. Journal of Experimental Medicine,1970,132(2):251 - 60.

[8] Erwin E S, Marco G J, Emery E M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography[J]. Journal of Dairy Science,1961,44(9):1768 - 1771.

[9] Lefebvre D E, Powell K L, Strom A, et al. Dietary proteins as environmental modifiers of type 1 diabetes mellitus [J]. Annual Review of Nutrition,2006,26:175 - 202.

[10] Ley R E, Bäckhed F, Turnbaugh P, et al. Obesity alters gut microbial ecology [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2005,102(31):11070 - 11075.

[11] 谭正怀,莫正纪. 三种肥胖动物模型研究概况[J]. 中国实验动物学杂志,2001,11(3):176 - 179.

[12] Wong J M, de Souza R, Kendall C W, et al. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids[J]. Journal of Clinical Gastroenterology,2006,40(3):235 - 243.

[13] Marshall E. Epidemiology. Public enemy number one: tobacco or obesity? [J]. Science,2004,304(5672):804.