

3种益生菌对抗生素相关性腹泻小鼠肠道乳酸杆菌数的影响

丘晓花, 刘霞, 钟平, 陈博, 万洁, 蒋杨* (广东医科大学生理科学实验室, 广东东莞 523000)

摘要: **目的** 观察双歧杆菌活菌、酵母片及乳酸菌素片对抗生素相关性腹泻(ADD)小鼠肠道乳酸杆菌数的影响。**方法** 40只1月龄小鼠用抗生素灌胃制作ADD模型, 随机分为模型组、双歧杆菌活菌组、酵母片组、乳酸菌素片组, 另取10只小鼠作为空白组; 空白组与模型组给予蒸馏水灌胃, 双歧杆菌活菌组、酵母片组、乳酸菌素片组分别给予0.175 g/kg双歧杆菌活菌胶囊、0.6 g/kg酵母片、0.9 g/kg乳酸菌素片灌胃, 连用9 d; 采用实时荧光定量PCR检测小鼠盲肠内乳酸杆菌含量。**结果** 与空白组比较, 模型组盲肠内乳酸杆菌群含量明显减少($P<0.01$); 经过2~8 d治疗, 双歧杆菌活菌组、酵母片组及乳酸菌素片组盲肠内乳酸杆菌群含量明显高于模型组($P<0.01$), 以乳酸菌素片组更为显著($P<0.01$)。**结论** 双歧杆菌活菌、酵母片及乳酸菌素片对ADD小鼠肠道乳酸杆菌数具有调理作用, 其中乳酸菌素片效果更好。

关键词: 益生菌; 抗生素相关性腹泻; 小鼠

中图分类号: R 978.1

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2022) 04-0384-04

Effect of three probiotics on the number of intestinal lactobacilli in mice with antibiotic-associated diarrhea

QIU Xiao-hua, LIU Xia, ZHONG Ping, CHEN Bo, WAN Jie, JIANG Yang* (Physiological Science Laboratory, Guangdong Medical University, Dongguan 523000, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of live bifidobacteria, yeast tablets and lactobacillus tablets on the number of intestinal lactobacilli in mice with antibiotic-associated diarrhea (ADD). **Methods** Forty 1-month-old mice were chosen to establish ADD models by intragastrical antibiotics, and then randomized to model, live bifidobacteria, yeast tablet and lactobacillus tablet groups; 10 mice acted as blank group. The distilled water was intragastrically given in blank and model groups, while 0.175 g/kg live bifidobacteria capsules, 0.6 g/kg yeast tablets, and 0.9 g/kg lactobacillus tablets were respectively given for 9 days in live bifidobacteria, yeast tablet and lactobacillus tablet groups. The number of cecal lactobacilli was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** The number of cecal lactobacilli was lower in model group than in blank group ($P<0.01$). Compared with model group, the number of cecal lactobacilli was increased in 3 probiotic groups ($P<0.01$), especially in lactobacillus tablet group ($P<0.01$). **Conclusion** The live bifidobacteria, yeast tablet and lactobacillus tablet can regulate the number of intestinal lactobacilli in mice with ADD, with the best of lactobacillus tablet.

Key words: probiotics; antibiotic-associated diarrhea; mice

许多研究显示益生菌具有抗炎和调节肠道菌群的作用^[1-5], 通过口服活菌, 增加肠道内活菌数量, 以促进和维持肠道内微生态平衡, 对肠道内病原菌直接或间接产生影响, 从而排除致病菌和条件致病菌侵袭^[6-10], 而且益生菌具有良好的耐受性和极少的不良反应^[11], 使其成为治疗抗生素相关性腹泻(ADD)的一种较佳的药物。虽然益生菌在ADD治疗的临床应用中越来越常见, 但并不是所有的益生菌对ADD治疗都有效。本研究选取市场销售的3种常见益生菌制剂对ADD

小鼠进行治疗, 采用实时荧光定量PCR对治疗前后肠道内乳酸杆菌属的动态变化进行检测, 研究这3种益生菌制剂对乳酸杆菌属含量的改变, 为临床选择益生菌制剂提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物与试剂

SPF级昆明小鼠(广东医科大学实验动物中心提供); 乳酸杆菌标准菌种(广东医科大学病原生物实验

收稿日期: 2021-11-10

基金项目: 广东医科大学科研基金项目(M20170280)

作者简介: 丘晓花(1982-), 女, 硕士研究生, 实验师, E-mail: 315060005@qq.com

通信作者: 蒋杨(1980-), 女, 硕士研究生, 实验师, E-mail: apin1999@163.com

室提供);江中乳酸菌素片(国药准字H20059905);丽珠双歧杆菌活菌胶囊(国药准字S10960040);天桥牌干酵母片(国药准字H44022243);细菌基因组DNA快速抽提试剂盒、溶菌酶、SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒,购于生物工程(上海)股份有限公司;TB GreenR Premix Ex TaqTM (Tli RNaseH Plus)购于宝生物大连(TaKaRa)生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及造模 将SPF级1月龄、雌雄不限、体质量18~25 g的58只小鼠随机分为空白组14只和试验组44只。空白组小鼠每天灌胃等体积蒸馏水,试验组小鼠经抗生素灌胃,在第3天后出现畏寒、胃纳差、毛色光泽、翻毛、黄色稀粪等腹泻症状。随机取出空白组4只、试验组4只小鼠,处死后取等量盲肠内容物,参考文献^[10]进行细菌学检测。除肠杆菌外,试验组动物肠道中3种优势菌明显减少,与空白组相比有显著差异。临床观察和菌群失调分析说明本次试验ADD造模成功。

1.2.2 试验分组、取样和DNA提取 将制备成功的40只AAD小鼠模型,随机分为模型组、乳酸菌素片组、双歧杆菌活菌组、酵母片组4组,每组10只。乳酸菌素片成人3.6~7.2 g/d,选定每人7.2 g/d为实验用药剂量,按照标准动物的等效剂量折算系数法,换算成小鼠的等效剂量为每只0.018 g/d(标准体质量20 g),即0.9 g/kg,每日1剂;双歧杆菌活菌胶囊成人0.7~1.4 g/d,选定1.4 g/(人·d)为实验用药剂量,按照标准动物的等效剂量折算系数法,换算成小鼠的等效剂量为每只0.0035 g/d(标准体质量20 g),即0.175 g/kg,每日1剂;酵母片成人2.4~4.8 g/d,选定每人4.8 g/d为实验用药剂量,按照标准动物的等效剂量折算系数法,换算成小鼠的等效剂量为每只0.012 g/d(标准体质量20 g),即0.6 g/kg,每日1剂。空白组和模型组每天分别灌胃等体积蒸馏水,在用药8 d后颈椎脱臼处死后采样,分别采集各组盲肠段粪便,充分暴露粪便于灭菌离心管内,加入适量灭菌PBS于振荡器上混匀后,离心取上清后,收集细菌沉淀于离心管中。采用细菌总DNA抽提试剂盒提取总DNA,于-20℃保存。

1.2.3 标准品的制备 按照细菌DNA提取试剂盒提取乳酸杆菌的标准菌株的基因组DNA,以乳酸杆菌标准菌株基因组DNA为模板进行常规PCR扩增。根据NCBI上公布的乳酸杆菌16S ribosomal RNA序列(GenBank: MH810314.1)设计常规PCR引物,序列S1: 5'-TGGAAGAACACCAGTGGCGAAGG-3', A1

5'-TCACCAGAGTGCCCAACTAAATGC-3',扩增片段大小为447 bp。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。扩增体系为:模板1 μL,上下游引物(10 μmol/L)各1 μL,2×Taq PCR Master Mix 10 μL,加ddH₂O至20 μL。反应条件:94℃预变性5 min,94℃变性40 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,30个循环;72℃延伸5 min,4℃保存。在2%琼脂糖凝胶中进行电泳,并按照胶回收试剂盒说明书回收切胶。回收PCR产物用核酸测定仪测定其水平(OD₂₆₀值),由公式 $(50 \times 10^{-6} \text{ g/mL} \times \text{OD}_{260} \times N) / (660 \times \text{产物碱基数})$ 计算拷贝数Copies/mL(N为阿伏加德罗常数)。

1.2.4 目的基因特异性引物的设计和合成 根据NCBI上公布的乳酸杆菌16S ribosomal RNA序列(GenBank: MH810314.1)设计FQ-PCR特异性引物,上游引物:5'-CTGTAAGTACGCTGAGATT-3',下游引物:5'-TG AAGGGCGGAAACC-3',扩增片段大小为110 bp。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.5 标准曲线的建立 用ddH₂O以10⁻¹~10⁻⁸梯度倍比稀释已知拷贝数的标准品为模板,同时设置阴性对照,反应体系为:Taq2×PCR Master Mix 5 μL,上下游引物(10 μmol/L)各0.45 μL,模板2 μL,加ddH₂O至25 μL。反应程序为预变性:95℃30 s;扩增:95℃变性30 s;60℃延伸40 s;扩增40个循环,在60℃采集荧光。以标准品的C_q值为横坐标,拷贝数的对数为纵坐标,绘制标准品扩增曲线图。

1.2.6 样品FQ-PCR检测 分别取各样本所提取的基因组原液2 μL作为模板进行FQ-PCR检测,每个样本重复测定3次,获得C_q值,3次测定结果的平均值为最终测定结果,根据标准曲线计算出基因组拷贝数。

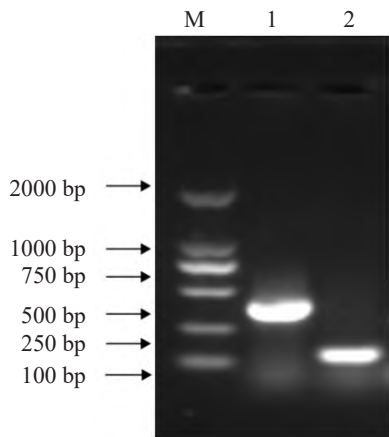
1.3 统计学处理

采用SPSS16.0软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 标准品和目的基因扩增产物的鉴定

制备标准品的PCR产物长度覆盖荧光定量PCR引物位置,PCR产物经2%的琼脂糖凝胶电泳,可见约450 bp和110 bp特异性条带,大小与预期一致,如图1。测序结果与NCBI上公布的乳酸杆菌16S ribosomal RNA序列(GenBank: MH810314.1)相比同源性和100%。



M.DL2000 DNA maker; 1. 标准品 PCR 产物; 2. 目的基因 PCR 产物

图1 标准品和目的基因PCR产物电泳图

2.2 乳酸杆菌FQ-PCR 标准曲线

乳酸杆菌标质量浓度为 35.8 mg/L，拷贝数为 7.31×10^{10} copies/ μ L。重复管 C_q 值之差在 0.5 以内，连续 10 倍梯度质量浓度之间 C_q 值之差在 17 左右。以模板质量浓度的对数为横坐标， C_q 值为纵坐标，获得标准曲线方程： $y = -3.4779x + 38.483$ 。其模板质量浓度的对数与 C_q 值之间呈较好的线性关系，相关系数为 0.9843，斜率为 -3.4779，扩增效率为 93.87%。标准品扩增曲线、溶解曲线、标准曲线分别如图 2、3、4。

2.3 ADD 小鼠肠内乳酸杆菌属的定量检测结果

与空白组比较，模型组小鼠盲肠内乳酸杆菌群含量明显减少，经过 2~8 d 的治疗，双歧杆菌活菌组、酵母片组与乳酸菌素片组的小鼠盲肠内乳酸杆菌群含量明显高于模型组 ($P < 0.01$)，以乳酸菌素片组更为显著 ($P < 0.01$)，见表 1。

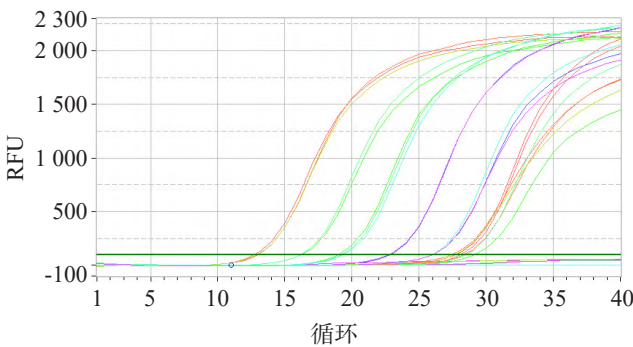


图2 标准品扩增曲线

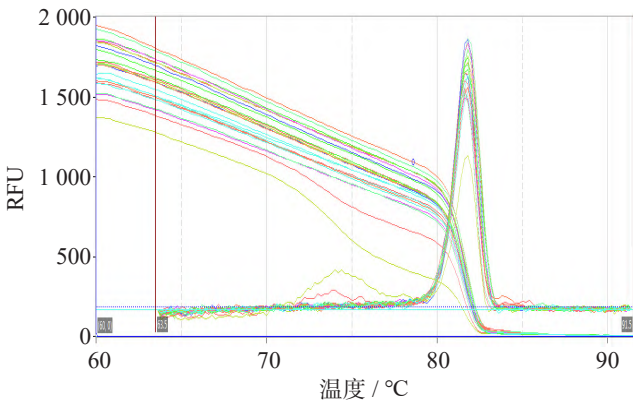


图3 标准品熔解曲线

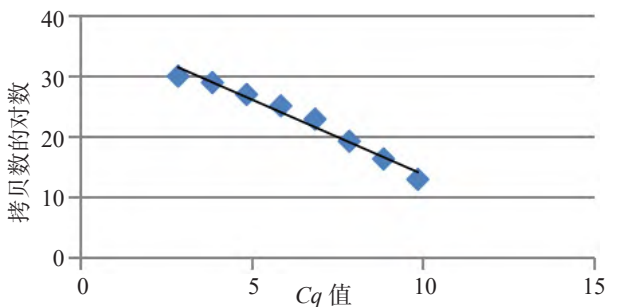


图4 标准曲线

表1 盲肠内乳酸杆菌群基因组拷贝对数值 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	2 d	4 d	6 d	8 d
空白组	5.57±0.10	5.52±0.08	5.27±0.02	5.33±0.04
模型组	1.47±0.22 ^a	2.17±0.27 ^a	3.05±0.06 ^a	4.64±0.21 ^a
双歧杆菌活菌组	3.95±0.24 ^{ab}	4.78±0.15 ^{ab}	5.37±0.08 ^{ab}	5.56±0.09 ^{ab}
酵母片组	4.16±0.08 ^{abc}	4.47±0.02 ^{abc}	5.16±0.05 ^{abc}	5.77±0.04 ^{abc}
乳酸菌素片组	4.49±0.07 ^{abcd}	4.76±0.11 ^{abd}	5.85±0.00 ^{abcd}	6.43±0.14 ^{abcd}

与空白组比较：^a $P < 0.01$ ；与模型组比较：^b $P < 0.01$ ；与双歧杆菌活菌胶囊比较：^c $P < 0.01$ ；与酵母片组比较：^d $P < 0.01$

3 讨论

益生菌是一类通过改善宿主菌群组成从而发挥有益作用的活性微生物^[12]。益生菌可以改变消化道的局部pH值，创造一个不利于病原体生长的局部环境；产生细菌素，发挥窄谱或广谱的病原体抑制作用；调

节病原体衍生物的毒素，打断致病菌的群体效应；增强肠黏膜屏障功能；与病原体竞争营养物质以及粘附；还可以与上皮细胞和黏膜淋巴细胞进行交叉对话，发挥对天然免疫和特异性免疫的作用^[13-15]。

乳酸杆菌属是人或动物肠道中优势菌之一，它与人或动物关系密切。在人或动物的肠道菌群中，乳酸

杆菌是有益于宿主健康的微生物,它通过产生乳酸、过氧化氢和细菌素等抗菌物质,或通过竞争肠道黏附位点或小肠食糜内的营养来抑制致病菌;通过诱导黏附素分泌细胞表面因子、蛋白质及可溶性肽,或者通过阻止细胞凋亡等途径来增强肠道的屏障功能,从而保护肠道^[16-20]。

本实验采用抗生素灌胃昆明小鼠制备ADD模型,选取3种益生菌进行干预治疗,应用荧光定量PCR对空白组、模型组和3种益生菌干预组盲肠内乳酸杆菌群的动态变化进行了定量检测,结果表明模型组盲肠内乳酸杆菌群含量与空白组比较显著下降($P<0.01$),经过2~8 d的治疗,双歧杆菌活菌组、酵母片组与乳酸菌素片组的小鼠盲肠内乳酸杆菌群含量明显高于模型组($P<0.01$),以乳酸菌素片组更为显著($P<0.01$),说明双歧杆菌活菌、酵母片及乳酸菌素片对抗生素相关性腹泻(ADD)肠道乳酸杆菌数具有调理作用,其中乳酸菌素片效果更好。

参考文献:

- [1] KECHAGIA M, BASOULIS D, KONSTANTOPOULOU S, et al. Health benefits of probiotics: a review[J]. ISRN Nutr, 2015, 2013: 481651.
- [2] JOHNSTON B C, ALISON L. Probiotics for pediatric antibiotic-associated diarrhea: A meta-analysis of randomized placebo-controlled trials [J]. CMAJ, 2018, 175(4): 377-383.
- [3] RICHARDSON G, DOBISH R, PHARM B. Chemotherapy induced diarrhea[J]. J Oncol Pharm Practice, 2021, 13(4):181-198.
- [4] HEUVEL B V D, PEETERS M, HENDLISZ A, et al. Long-acting octreotide as secondary prevention of chemotherapy-induced diarrhea: Proof of concept[J]. Minerva Chir, 2020, 71(2): 91-97.
- [5] 钱美睿, 吴开春. 肠道菌群与疾病关系的研究进展[J]. 传染病信息, 2016, 29(5): 298-302.
- [6] 张常华, 吴菁. 肠道菌群在肠道屏障功能维护中的作用和机制[J]. 消化肿瘤杂志, 2017, 9(3): 162-167.
- [7] 臧文娟. II型糖尿病患者肠道中细菌群落结构研究[D]. 太原: 山西大学, 2015.
- [8] FLINT H J, DUNCAN S H, SCOTT K P, et al. Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism[J]. Proc Nutr Soc, 2020, 74(1): 13-22.
- [9] 黄蓉, 蒋鸿超, 张桢, 等. 一种基于 V P6 基因的A组轮状病毒拷贝数荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国生物制品学杂志, 2019, 32(5): 575-578.
- [10] 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, 2019, 39(5): 155-165.
- [11] 宋晓敏, 李少英, 马春艳, 等. 发酵食品中乳酸菌的耐药性现状分析[J]. 微生物学报, 2015, 42(1): 207-213.
- [12] 贾彦, 江岩, 明珠, 等. 高质量人体粪便细菌 16S rDNA V3 区扩增方法[J]. 生物技术, 2016(5): 456-462.
- [13] 张娜娜, 刘洋, 俞漪, 等. 乳酸菌饮料中嗜酸乳杆菌的实时荧光定量PCR检测方法[J]. 食品科学, 2019, 40(8): 27-32.
- [14] 梁子英, 刘芳. 实时荧光定量 PCR 技术及其应用研究进展[J]. 现代农业科技, 2020(6): 13-18.
- [15] 汪婷婷, 郑乃, 袁向亮, 等. 基于 16S rRNA 高通量测序技术分析小鼠实验性结肠炎肠道菌群结构特征[J]. 诊断学理论与实践, 2019, 18(3): 263-270.
- [16] 秦倩倩, 张玲, 王国庆. 实时荧光 PCR 定量检测粪便中 Akkermansia muciniphila 方法研究 [J]. 四川大学学报 (医学版), 2018, 49(1): 93-97.
- [17] 李望, 耿燕, 任怡琳, 等. 猴头菌粉对结肠炎小鼠肠道菌群的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(9): 97-102.
- [18] 吴昊, 于小红, 焕君, 等. 雷公藤对右旋葡聚糖硫酸钠诱导的溃疡性结肠炎小鼠肠道菌群的影响[J]. 中草药, 2020, 51(2): 387-396.
- [19] 章文明, 汪海峰, 刘建新. 乳酸杆菌益生作用机制的研究进展[J]. 动物营养学报, 2012, 24(3): 389-396..
- [20] 刘茜明, 杨光勇, 何光志, 等. 葛根苓连汤对抗生素相关腹泻肠道乳酸菌属的影响研究 [J]. 家畜生态学报, 2016, 37(11): 74-78.