



李昊霞, 张道亮, 薛之霖, 张天琳, 冯士彬, 赵畅, 王希春, 李玉. 发酵乳对肥胖小鼠肝脂代谢和肠道菌群的影响[J]. 中国农业大学学报, 2024, 29(08):120-133.
LI Haoxia, ZHANG Daoliang, XUE Zhilin, ZHANG Tianlin, FENG Shibin, ZHAO Chang, WANG Xichun, LI Yu. Effects of fermented milk on liver lipid metabolism and intestinal flora in obese mice[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2024, 29(08):120-133.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2024.08.10

发酵乳对肥胖小鼠肝脂代谢和肠道菌群的影响

李昊霞¹ 张道亮¹ 薛之霖¹ 张天琳² 冯士彬¹ 赵畅¹ 王希春¹ 李玉^{1*}

(1. 安徽农业大学 动物科技学院, 合肥 230031

2. 山东农业大学 动物科技学院, 山东 泰安 271000)

摘要 为分析发酵乳对肥胖小鼠肝脂代谢和肠道菌群的影响, 本研究将60只C57BL/6小鼠随机分为5组: 正常对照组(CON)、模型组(MD)、易善复组(YG)、低浓度发酵乳干预组(LFG)和高浓度发酵乳干预组(HFG)。肥胖模型造模成功后进行为期6周的灌胃, 试验结束测量小鼠的空腹体重和身长, 计算LEE'S指数, 采血检测生化指标, 采集肝脏组织观察病理变化; 采集小鼠盲肠内容物进行肠道菌群测序。结果表明: 1) 与CON相比, MD小鼠体重、LEE'S指数、ALT和AST均极显著提升($P < 0.01$), 表明肥胖模型建立成功。2) 与MD相比, 发酵乳干预组小鼠体重、LEE'S指数、ALT和TC均极显著下降($P < 0.01$), 其中AST和TG显著下降($P < 0.05$), 同时发酵乳和易善复组小鼠肝组织脂肪变性有明显好转, 基本没有明显的脂肪空泡。表明发酵乳可以抑制肥胖小鼠体重的增加, 改善肥胖小鼠的肝脂代谢功能。3) 与MD相比干预组小鼠肠道菌群的多样性水平有一定程度的恢复, 尤其是厚壁菌门和拟杆菌门。表明发酵乳对于小鼠肠道菌群多样性的恢复有一定的作用。综上, 本研究阐明了发酵乳对肥胖小鼠肝脂代谢和肠道菌群的影响, 为功能型发酵乳的开发提供理论依据。

关键词 发酵乳; 肥胖; 肝脂代谢; 肠道菌群

中图分类号 S856.5

文章编号 1007-4333(2024)08-0120-14

文献标志码 A

Effects of fermented milk on liver lipid metabolism and intestinal flora in obese mice

LI Haoxia¹, ZHANG Daoliang¹, XUE Zhilin¹, ZHANG Tianlin², FENG Shibin¹,
ZHAO Chang¹, WANG Xichun¹, LI Yu^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230031, China;

2. College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271000, China)

Abstract To analyze the effects of fermented milk on liver lipid metabolism and intestinal microbiota in obese mice, sixty C57BL/6 mice were randomly divided into five groups: control group (CON), model group (MD), Yishanfu group (YG), low concentration fermented milk intervention group (LFG), and high concentration fermented milk intervention group (HFG). After successful modeling of obesity, a 6-week gastric lavage was performed. At the end of the experiment, the weight and length of the mice were measured after fasting, the LEE'S index was calculated, the blood was collected for biochemical indicators and pathological changes in liver tissue were observed, and cecal contents were obtained from mice for gut microbiota sequencing. The results showed that: 1) Compared with CON, the body weight, LEE'S index, ALT, and AST of MD mice were significantly increased ($P < 0.01$), indicating that the obesity model was

收稿日期: 2023-09-13

基金项目: 优才计划学生发展支持项目(XSZ2021003)

第一作者: 李昊霞(ORCID:0009-0008-7837-0825), 硕士研究生, E-mail: Li.haox@qq.com

通讯作者: 李玉(ORCID:0000-0002-9886-4952), 副教授, 主要从事畜禽营养代谢病与中毒病研究, E-mail: lydhy2014@ahau.edu.cn

successfully established. 2) Compared with MD, the body weight, LEE'S index, ALT, and TC of the fermented milk intervention group mice were significantly reduced ($P < 0.01$), with AST and TG significantly reduced ($P < 0.05$). At the same time, the fatty degeneration of liver tissue in the fermented milk and Yishanfu group of mice was significantly improved, with almost no obvious fat vacuoles, indicating that fermented milk can inhibit the weight gain of obese mice, and improve their liver lipid metabolism function. 3) Compared with MD, the diversity level of intestinal microbiota in the intervention group of mice showed a certain degree of recovery, especially in the Firmicutes and Bacteroidetes. It indicated that fermented milk had a certain effect on the restoration of intestinal microbiota diversity in mice. In summary, this study clarified that effects of fermented milk on liver lipid metabolism and intestinal flora in obese mice, providing a theoretical basis for the development of functional fermented milk.

Keywords fermented milk; obesity; liver lipid metabolism; intestinal microbiota

随着中国经济的快速发展和物质水平的不断提高,目前已超过美国成为了现阶段全球范围内肥胖人数最多的国家,并且肥胖率依然在逐年升高^[1]。肥胖是一种在人体和动物体中均常见的慢性疾病,其以脂质代谢紊乱和能量失调为特征^[2-3]。除了肥胖自身带来的对健康的影响以外,肥胖还是人们患多种严重慢性疾病最直接的原因,可引发高血压、高血脂、冠心病等心脑血管疾病,还包括非酒精性脂肪肝和Ⅱ型糖尿病等疾病^[4]。目前人们治疗肥胖的方式主要包括控制卡路里、进行体育锻炼,还没能找到一种能够有效控制肥胖且副作用较小的特异性药物。

人类和动物体内均有数量巨大的微生物群,并与宿主形成共生关系,肠道微生物群即为分布在肠道内的细菌。肠道微生物群对人类的健康与疾病具有重要的调节作用^[5]。其中发挥主要作用的是益生菌,如乳酸杆菌、嗜热链球菌、双歧杆菌、保加利亚乳杆菌和鼠李糖乳杆菌等。发酵乳制品就是利用其中的益生菌来调理肠道微生物群,也因此食用发酵乳制品有望成为改善肥胖症和改善肝脂代谢的有效方式^[6]。益生菌通过利用宿主本身不具备的代谢通路来调节相应的肠道微生物的结构和数量从而对机体的肠道菌群、免疫系统以及生长状况产生影响^[7],因此益生菌对于促进机体健康和生长发挥着至关重要的作用。而肠道微生物群失调会引起多种疾病并使宿主的免疫水平急剧降低,如类风湿性关节炎;同时代谢紊乱还会导致糖尿病、肥胖、非酒精性脂肪性肝病和心血管疾病的发生;胃肠道相关疾病和神经系统疾病也时有发生,因此改善肠道微生物群成为了目前科研人员试图解决多种疑难杂症的新突破口^[8]。

有研究表明除了生活方式的改变之外,通过食

用发酵乳制品利用其中的微生物可以将营养物质转换为粘稠的胶状物从而减少营养的摄入,也有助于降低血清谷氨酸水平,促进脂质的代谢,减少脂质沉积^[9]。发酵乳制品是以生牛乳或羊乳为原材料发酵获得的,其在各种益生菌的互生作用下将乳糖转化为乳酸及多种营养物质,除了蛋白质、脂质、碳水化合物等基本成分以外,还包括益生菌、益生元及游离物质,这也极大提高了发酵乳制品的营养价值,近年来在全球都成为消费热度极高的产品。

仅凭借单一的治疗方式往往难以在改善肥胖方面取得良好的效果,从膳食层面利用发酵乳制品来干预肥胖引起的肝脏病变和肠道菌群的紊乱有可能能够干预并且改善肥胖的发生发展,然而目前发酵乳制品对于肝脂代谢和肠道菌群影响的相关研究较少,因此本文主要通过研究发酵乳制品对肥胖小鼠肝脂代谢和肠道菌群的影响来进一步确定发酵乳制品是否对机体具有改善作用,为功能型发酵乳的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

6周龄近交系C57BL/6雄性小鼠共60只购自杭州子源试验动物科技有限公司(生产许可证:SCXK(浙)2019—0004)。试验动物饲养在安徽农业大学动物科技学院动物房间内,饲养条件为温度20~24℃,相对湿度40%~70%,光照时间每日12h。

1.2 试验饲料

普通饲料,高脂饲料配比(以下均为质量分数):0.2%胆盐、20%猪油、2%胆固醇、16%白糖及高蛋白质营养基础饲料(批号:GZ20211026,南京盛民科研动物养殖场)。

1.3 试验试剂及药品

血清甘油三酯(TG)试剂盒、总胆固醇(TC)试剂盒、丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂盒、天冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒均购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司;发酵乳(卡士007无蔗糖益生菌家庭装发酵乳)购自深圳市柏赞贸易有限公司,含保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌、乳双歧杆菌、鼠李糖乳杆菌等菌株,益生菌含量 $\geq 1.00\times 10^9$ CFU/100 g;易善复多烯磷脂酰胆碱胶囊购自阿里健康大药房医药连锁有限公司。

1.4 试验设计

将60只近交系C57BL/6的6周龄雄性小鼠适应性饲养一周后(在温度 (22 ± 2) ℃,相对湿度40%~70%,光照时间每日12 h的条件下饲养),随机分成5组,分别为正常对照组(CON)、模型组(MD)、易善复组(YG)、低浓度发酵乳干预组(LFG)和高浓度发酵乳干预组(HFG),每组12只(图1)。小鼠的肥胖模型构建需要采用高脂饲料作为饲料,模型组、易善复组、低浓度发酵乳干预组和高浓度发酵乳干预组小鼠在饲养期内持续饲喂高脂饲料,而正常对照组则饲喂普通饲料;每周测量小鼠体重、进食量、进水量进行记录,根据体

重调整进食量在试验结束时确定小鼠体重的增长率。造模成功后低浓度发酵乳干预组和高浓度发酵乳干预组小鼠将会进行6周的发酵乳灌胃干预,易善复组用易善复灌胃,正常对照组和模型组用生理盐水灌胃,其中低浓度发酵乳干预组和高浓度发酵乳干预组的发酵乳浓度分别为0.2 mL/10 g·BW和0.4 mL/10 g·BW。在试验结束前一天,所有小鼠禁食不禁水12 h。第二天空腹完成体重和体长的测量,并计算LEE'S指数,公式如(1)所示:

$$LEE'S\ Index=m^{1/3}\times 10^3/L\tag{1}$$

式中: m 为体重,kg; L 为体长(从鼻子到肛门的距离),cm。

之后从眶下静脉丛获取血液样本,将血液样本常温静置30 min后3 000 r/min离心15 min分离获得血清。断颈处死后采集小鼠的肝脏组织,将其放入10%的甲醛溶液中加以稳定,一部分保存到-80℃冰箱保存备用,同时无菌取小鼠盲肠内容物于PE管中,置于-80℃冰箱中保存备用。

1.5 小鼠血清生化指标的测定

取分离后的血清0.2 mL,采用全自动生化指标仪测定小鼠血清的TG、TC、AST和ALT。

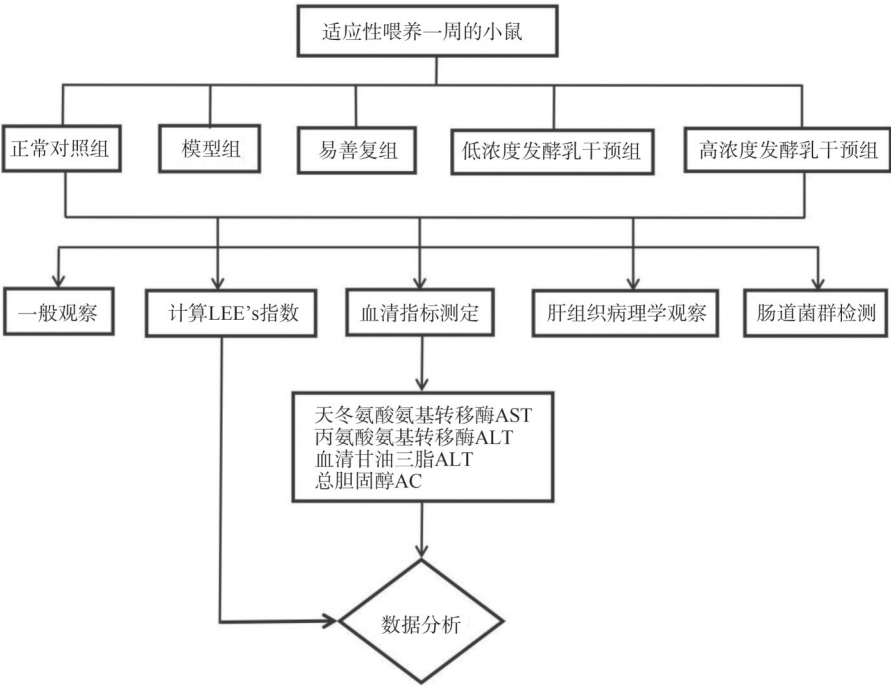


图1 试验步骤流程图

Fig. 1 Diagram of the experimental procedure

1.6 小鼠肝组织病理学观察

从采取的肝脏组织中剪下大约 5 mm×10 mm×2 mm 的组织,经多聚甲醛固定后通过 HE 染色步骤制成病理组织切片,将其放入高倍镜下仔细观察其组织细胞结构,然后通过光学显微技术对其病理变化做出准确的诊断和评价。

1.7 小鼠肠道菌群的检测

将采集到的盲肠内容物送至苏州帕诺米克生物药科技有限公司进行 16S rRNA 高通量肠道菌群测序分析。

1.8 数据统计与分析

使用 GraphPad Prism 7 软件对数据进行处理,结果以“平均值±标准差”表示。多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),采用 LSD 检

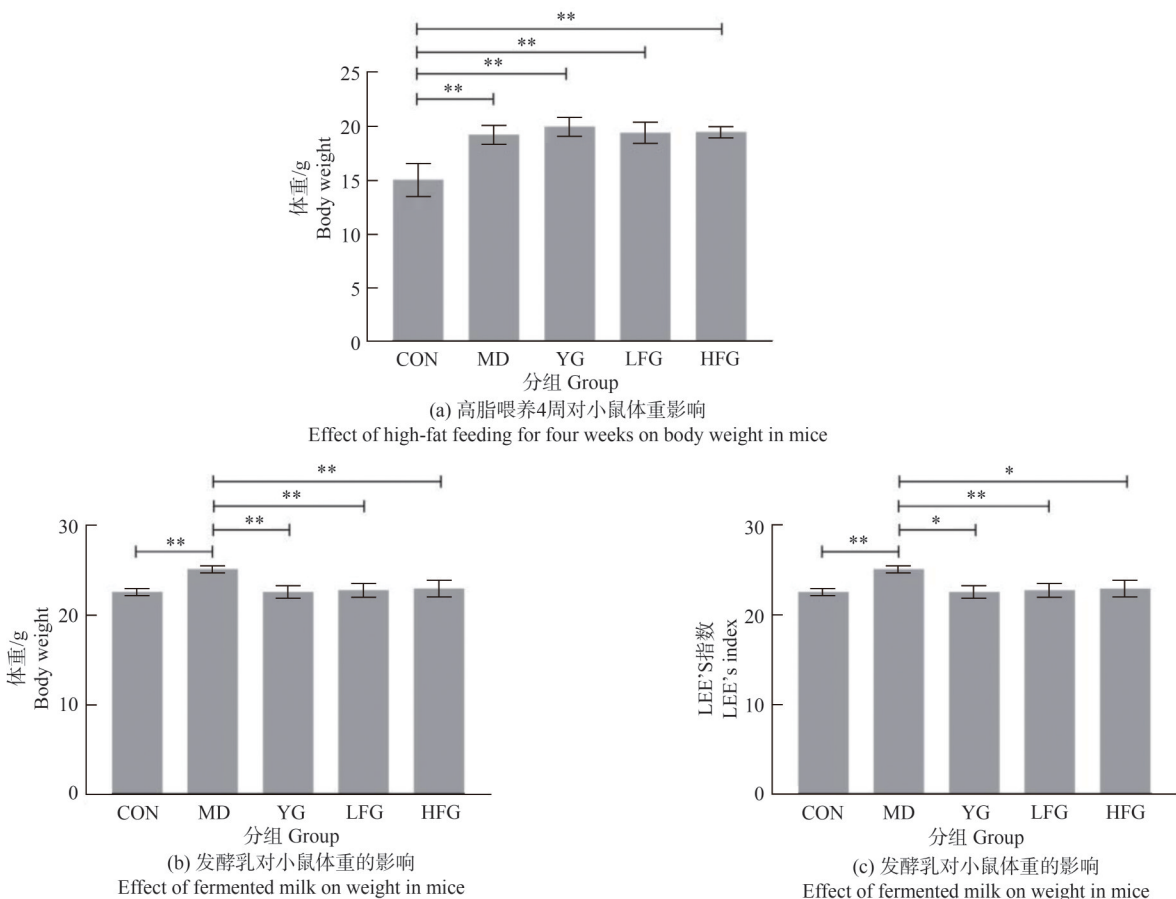
验进行多重比较,* $P<0.05$ 表示差异显著;** $P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 发酵乳对小鼠的体重和 LEE'S 指数的影响

通过高脂饮食喂养 4 周之后,正常对照组、模型组、易善复组、低浓度发酵乳干预组和高浓度发酵乳干预组小鼠体重分别达到 15.04 ± 1.83 、 19.22 ± 0.92 、 19.38 ± 1.45 、 19.46 ± 2.12 和 19.96 ± 2.01 ,如图 2(a)所示,与正常对照组小鼠相比,模型组、易善复组、低浓度发酵乳干预组和高浓度发酵乳干预组小鼠体重极显著提升($P<0.01$),其余 4 组差异不显著($P>0.05$),可知已成功建立小鼠肥胖模型。

在 6 周的发酵乳和易善复干预后体重变化情况



CON:正常对照组;MD:模型组;YG:易善复组;LFG:低浓度发酵乳干预组;HFG:高浓度发酵乳干预组* $P<0.05$ 表示差异显著,** $P<0.01$ 表示差异极显著。下同。

CON:Control group;MD:Model group;YG:Yishanfu group;LFG:Low concentration fermented milk intervention group;HFG:High concentration fermented milk intervention group* $P<0.05$ indicates significant difference,* $P<0.01$ indicates extremely significant difference. The same below.

图 2 小鼠肥胖模型的建立(a)及发酵乳对小鼠体重(b)和 LEE'S 指数(c)的影响

Fig. 2 Establishment of mice obesity model (a) and effect of fermented milk on weight (b) and obesity index (c) in mice

如图2(b)所示,与正常对照组小鼠相比,模型组小鼠体重极显著提升($P<0.01$),易善复组、低浓度发酵乳干预组和高浓度发酵乳干预组小鼠体重差异不显著($P>0.05$);而与模型组相比易善复组、低浓度发酵乳干预组和高浓度发酵乳干预组小鼠体重均极显著下降($P<0.01$),然而易善复组、低浓度发酵乳干预组和高浓度发酵乳干预组3组小鼠之间体重差异不显著($P>0.05$)。LEE'S指数变化情况如图2(c)所示,与正常对照组小鼠相比,模型组小鼠LEE'S指数极显著提升($P<0.01$),易善复组、低浓度发酵乳干预组和高浓度发酵乳干预组小鼠的LEE'S指数差异不显著($P>0.05$);而与模型组相比,易善复组和高浓度发酵乳干预组小鼠LEE'S指数显著下降($P<0.05$),低浓度发酵乳干预组小鼠LEE'S指数极显著下降($P<0.01$);易善复组、低浓

度发酵乳干预组和高浓度发酵乳干预组3组小鼠之间LEE'S指数差异不显著($P>0.05$)。

此结果表明高脂喂养可以增加小鼠体重,低浓度和高浓度发酵乳和易善复的干预均可以有效抑制体重增加,进而改善肥胖小鼠的LEE'S指数。

2.2 发酵乳对小鼠肝功能指标的影响

如图3所示,与正常对照组小鼠相比,模型组小鼠的血清ALT极显著提升($P<0.01$),血清AST显著提升($P<0.05$);易善复组、低浓度发酵乳干预组和高浓度发酵乳干预组3组间小鼠血清ALT、AST差异不显著($P>0.05$)。与模型组小鼠相比,易善复组、低浓度发酵乳干预组和高浓度发酵乳干预组小鼠的血清ALT均极显著下降($P<0.01$),血清AST均显著下降($P<0.05$)。

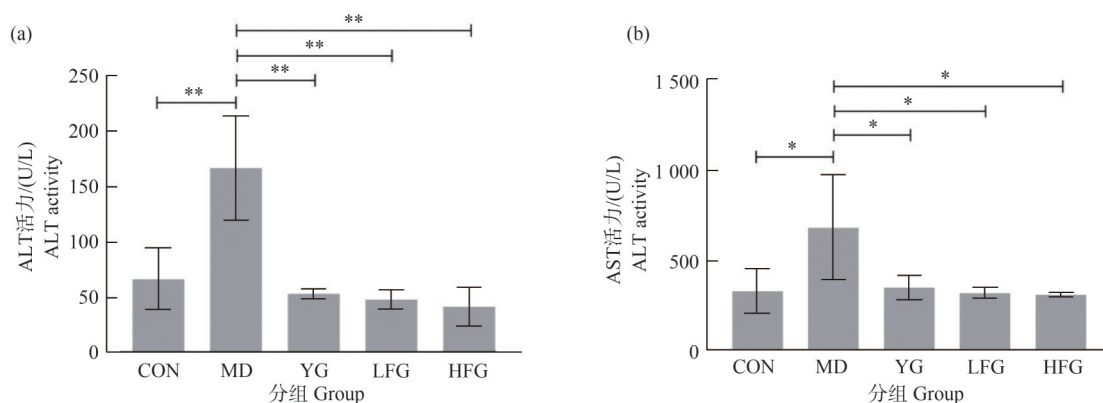


图3 发酵乳对小鼠血清ALT(a)和AST(b)活力的影响

Fig. 3 Effect of fermented milk on serum activity ALT(a) and AST(b) in mice

此结果表明长期的高脂喂养使得小鼠肝组织中的酶外泄肝细胞受到破坏,肝功能出现了严重病变,而易善复和发酵乳均具有良好的改善肥胖小鼠肝功能的效果。

2.3 发酵乳对小鼠血脂水平的影响

如图4所示,与模型组小鼠相比,易善复组小鼠的TC显著下降($P<0.05$),低浓度发酵乳干预组小鼠的TC极显著下降($P<0.01$);低浓度发酵乳干预组小鼠的TG浓度显著下降($P<0.05$),易善复组、高浓度发酵乳干预组小鼠的TG浓度差异不显著($P>0.05$)。

此结果表明长期高脂喂养可以使小鼠血脂水平升高,综合TC、TG结果可知易善复和发酵乳对于降低小鼠的血脂水平均有较好的效果,低浓度发

酵乳的改善效果更加明显。

2.4 发酵乳对小鼠肝脏病理变化的影响

如图5所示,通过对各组小鼠的HE切片进行观察发现正常对照组小鼠没有明显的脂肪肝且肝小叶结构完整,肝组织内无脂滴出现。而长期高脂喂养的小鼠肝脏均出现了较为明显的脂肪变性、炎症和坏死。病理学特点主要表现在肝小叶边界不清晰,胞浆内存在有脂滴空泡,但未见明显的纤维性变化。其中脂质占据大部分空间,且细胞核被挤向细胞一侧。在肝小叶的中心可见广泛炎症浸润和组织坏死。经发酵乳和易善复干预的小鼠肝组织脂肪变性有明显好转,基本没有明显的脂肪空泡,尤其是低浓度发酵乳组小鼠肝组织切片可见肝板整齐,肝血窦清晰,肝细胞中的脂肪空泡最少。

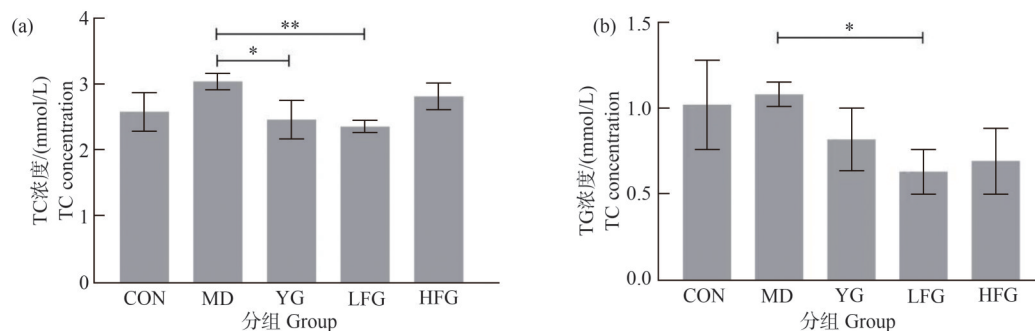
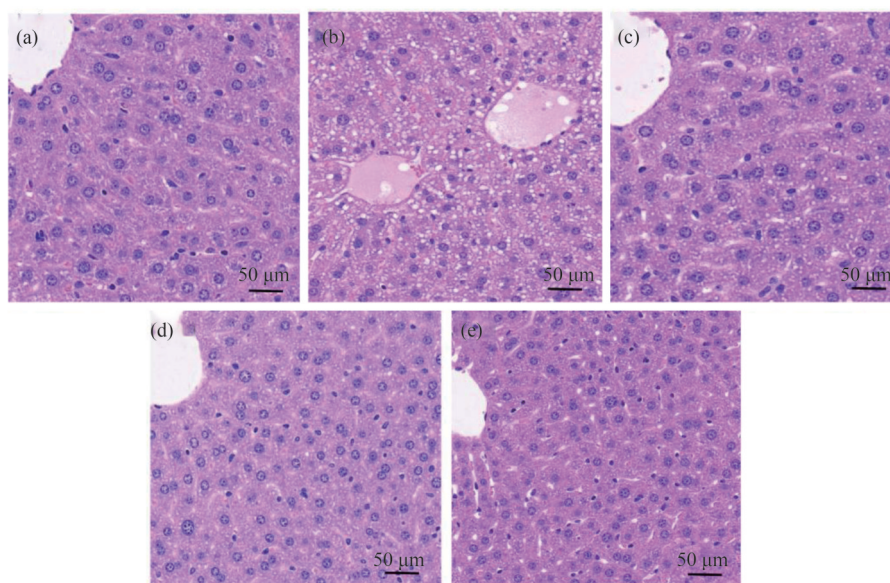


图 4 发酵乳对小鼠血清 TC(a) 和 TG(b) 浓度的影响

Fig. 4 Effect of fermented milk on serum concentration TC (a) and TG (b) in mice



(a) 正常对照组; (b) 模型组; (c) 易善复组; (d) 低浓度发酵乳干预组; (e) 高浓度发酵乳干预组

(a) CON group; (b) MD group; (c) YG group; (d) LFG group; (e) HFG group

图 5 小鼠肝脏组织病理变化 (×200)

Fig. 5 Pathological change of liver tissue in mice (×200)

此结果表明发酵乳和易善复均可明显改善小鼠肝脏发生的病理变化。

2.5 发酵乳对小鼠肠道菌群的影响

2.5.1 肠道菌群测序数据质量评估与分析

由图 6 所示, 经过 5 组小鼠盲肠内容物的 16S rRNA 测序发现, 随着样本量的增加, ASV/OTU 总数会出现明显的上升趋势, 表明新物种的出现可能性越来越大。然而, 当样本量达到一定程度时, 这一变化就会变得平缓, 从而使得物种累积曲线变得更加稳定。表明样本量已足以反映群落的物种组成。

通过使用 ASV/OTU 丰度表来创建 Venn 图, 从而更直观地展示出不同样本中 OTU 的多样性以

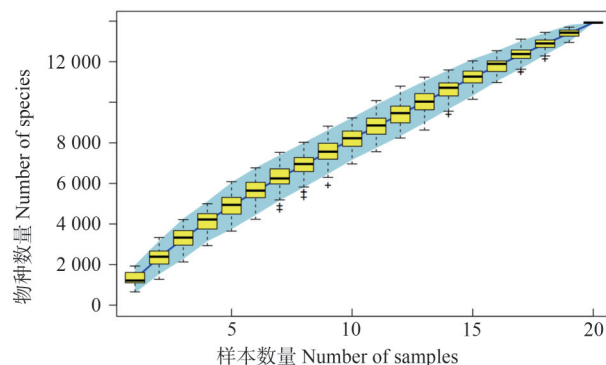
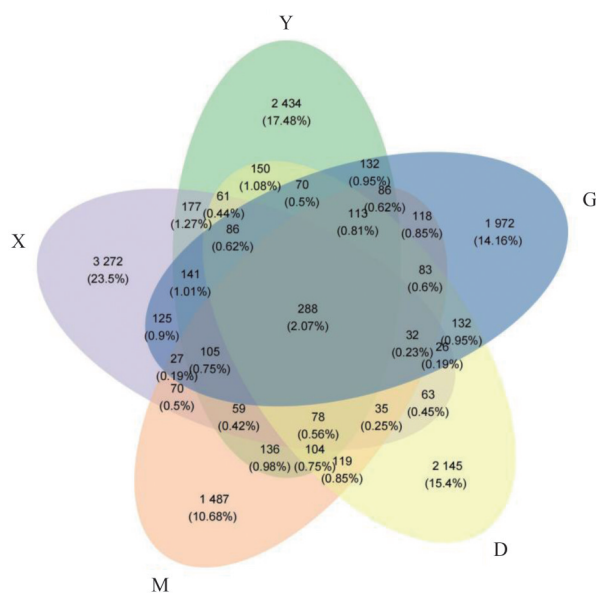


图 6 Specaccum 物种累积曲线

Fig. 6 Specaccum species accumulation curves

及它们之间的相互关系。由图 7 所示, 各组特异性/总的 OTU 数目分别为: 正常对照组 3 272/6 501、模



X: 正常对照组; M: 模型组; Y: 易善复组; D: 低浓度发酵乳干预组;
G: 高浓度发酵乳干预组。下同。

X: CON group; M: HFD group; Y: YG group; D: LFG group;
G: HFG group. The same below.

图7 各组小鼠肠道菌群 Venn 图

Fig.7 Venn diagram of intestinal flora of mice in groups

型组 1 487/3 897、易善复组 2 434/5 907、低浓度发酵乳干预组 2 145/4 742、高浓度发酵乳组 1 972/4 587, 各组共检测 OTU 数量 25 634 个, 其中共有 OTU 288 个, 为总 OTU 数的 2.07%。与正常对照组相比模型组的 OTU 数量降低; 而与模型组比较, 干预组的 OTUs 数目增加, 以上数据表明长期高脂饲料喂养使得小鼠的肠道菌群的多样性大大降低, 但在易善复和发酵乳的干预下小鼠肠道菌群的多样性水平有一定程度的恢复, 可初步表明易善复和发酵乳具有改善肥胖小鼠肠道菌群多样性的功能。

2.5.2 各组小鼠肠道微生物的 Alpha 多样性分析

Alpha 多样性是一个重要的指标, 它可以用来衡量肠道菌群的多样性, 可以通过 Chao 指数来反映物种群落的多样性, 而 Observed species 指数则可以用来衡量群落中物种的丰富程度。Shannon 指数可以用来衡量肠道微生物的多样性, 其值越高, 微生物的多样性就越高。Sobs 指数表示样本中所含物种的数目, 物种指数越高样品的丰富度越高。Coverage 指数可以作为一个衡量标准, 来评价不同类型的基因的可重复性, 它可以帮助我们更好地理解基因的多样性, 并且可以更准确地评价基因的复杂性。Spcaccum 可以更好地评价基因的多样性, 从

而更准确地估算基因的多样性。图 8 表明不同组的小鼠的 Observed species 指标存在一定的差异 ($P < 0.05$)。其中模型组小鼠的肠道菌群含量显著低于正常对照组和干预组小鼠。各组小鼠之间的多样性指数如 Faith's PD 指数、Shannon 指数等差异不显著 ($P > 0.05$), 但模型组小鼠的肠道菌群含量仍低于正常对照组和干预组小鼠, 表明正常对照组和试验组之间主要在肠道菌群的物种丰富程度上有显著变化, 对于物种多样性、基因的重复性和多样性方面并没有显著的增多或减少。这也进一步表明易善复和发酵乳对于改善小鼠肠道菌群, 增加物种群落丰富度有较为明显的作用。

2.5.3 各组小鼠肠道菌群组成与结构分析

2.5.3.1 门水平肠道菌群比较 由图 9 所示, 从微生物物种组成丰富度角度来看, 门水平主要包括 8 种优势菌属: 厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、变形菌门 (Proteobacteria)、疣状微孢子虫 (Verrucomicrobiota)、放线菌门 (Actinobacteria)、大肠杆菌门 (Epsilonbacteraeota)、脱铁杆菌门 (Deferribacteres) 和软壁菌门 (Tenericutes)。其中 Firmicutes 和 Bacteroidetes 是相对丰度最高的两大菌门, 与正常对照组相比, 模型组小鼠 Firmicutes 相对丰度增加, 差异显著 ($P < 0.05$), 与模型组相比, 易善复组和低浓度发酵乳干预组小鼠 Firmicutes 相对丰度降低, 差异显著 ($P < 0.05$); 与正常对照组相比, 模型组小鼠 Bacteroidetes 相对丰度降低, 差异极显著 ($P < 0.01$), 与模型组相比, 易善复和发酵乳干预组小鼠 Firmicutes 相对丰度增加, 差异显著 ($P < 0.05$)。表明易善复和低浓度发酵乳可以改变小鼠肠道菌群门水平的相对丰度, 可能主要是通过改变小鼠肠道菌群中的 Firmicutes 和 Bacteroidetes 的数量从而使小鼠对脂肪的消化吸收效果更好, 减少脂肪堆积。

2.5.3.2 属水平肠道菌群比较 由图 10 可知, 属水平主要有 20 多种菌属组成, 与正常对照组相比, 模型组小鼠菌属的相对丰度均不同程度地增加, 差异不显著 ($P > 0.05$), 与模型组相比, 易善复组和发酵乳干预组小鼠菌属相对丰度均不同程度地降低, 差异不显著 ($P > 0.05$) 但仍高于正常对照组。

2.5.4 KEGG 功能富集分析

由图 11 可知, 通过分析 KEGG 通路富集, 在所

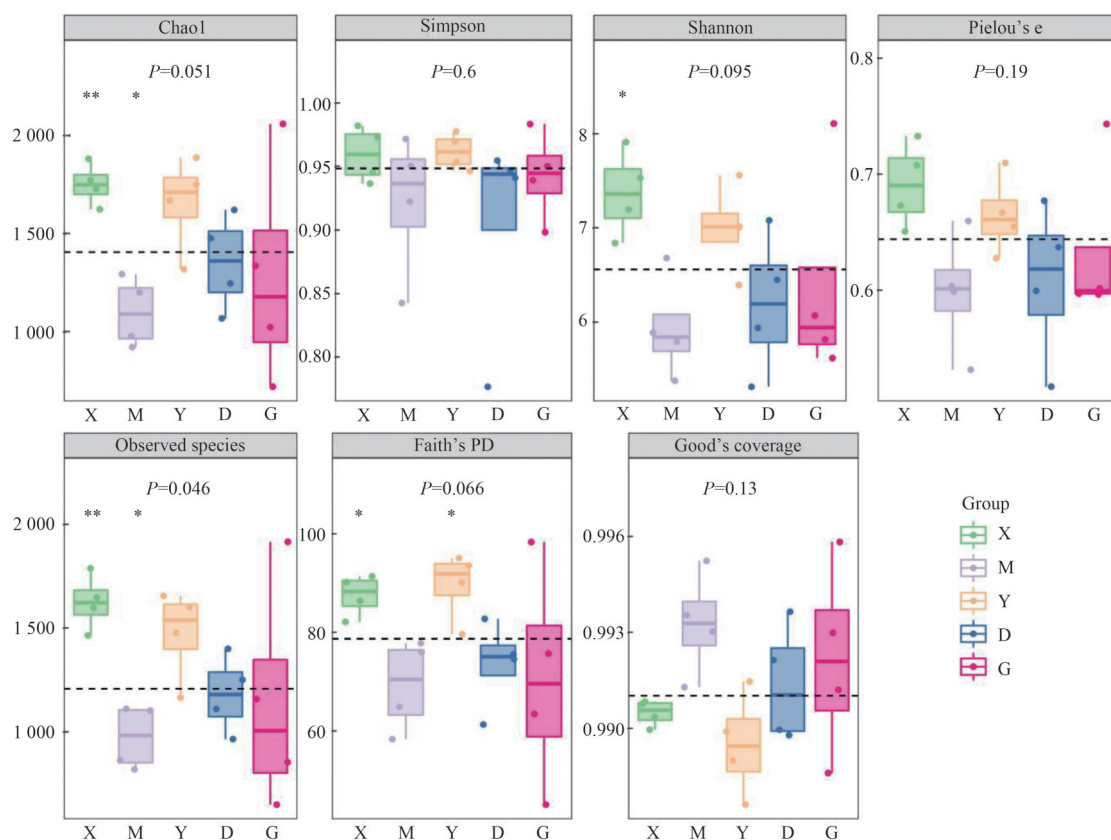


图 8 Alpha 多样性指数的分组箱线图

Fig. 8 Grouped box plot of the Alpha diversity index

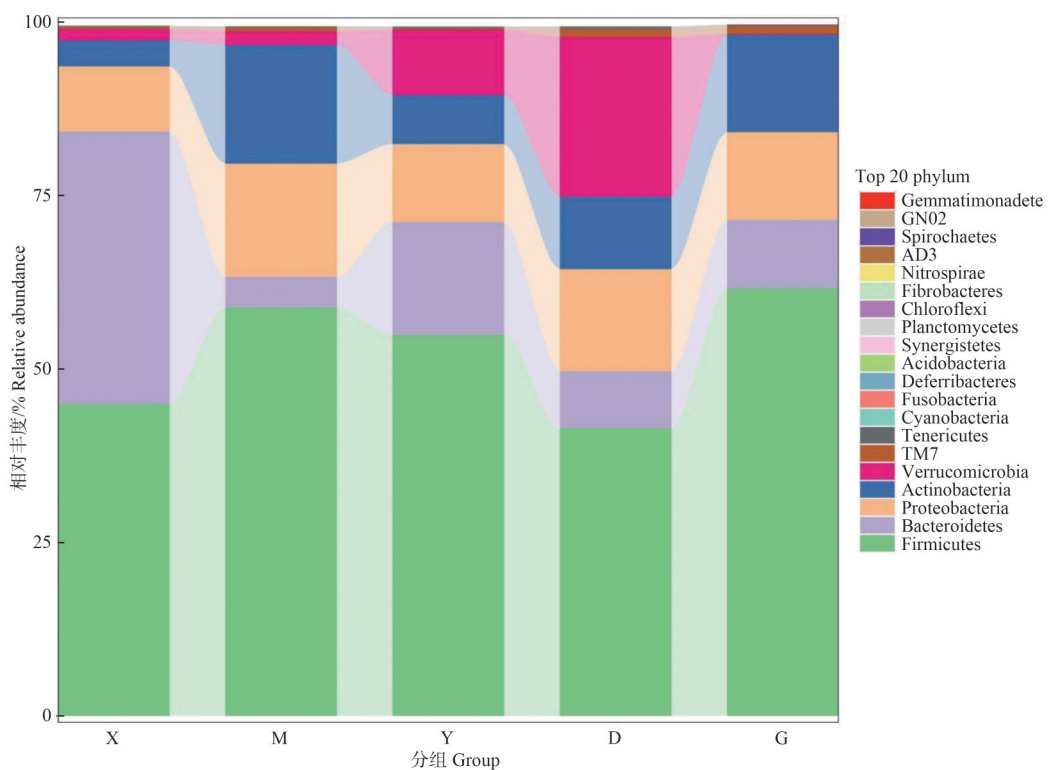


图 9 肠道微生物在门水平的组成及分布

Fig. 9 Composition and distribution of intestinal microorganisms at phylum level

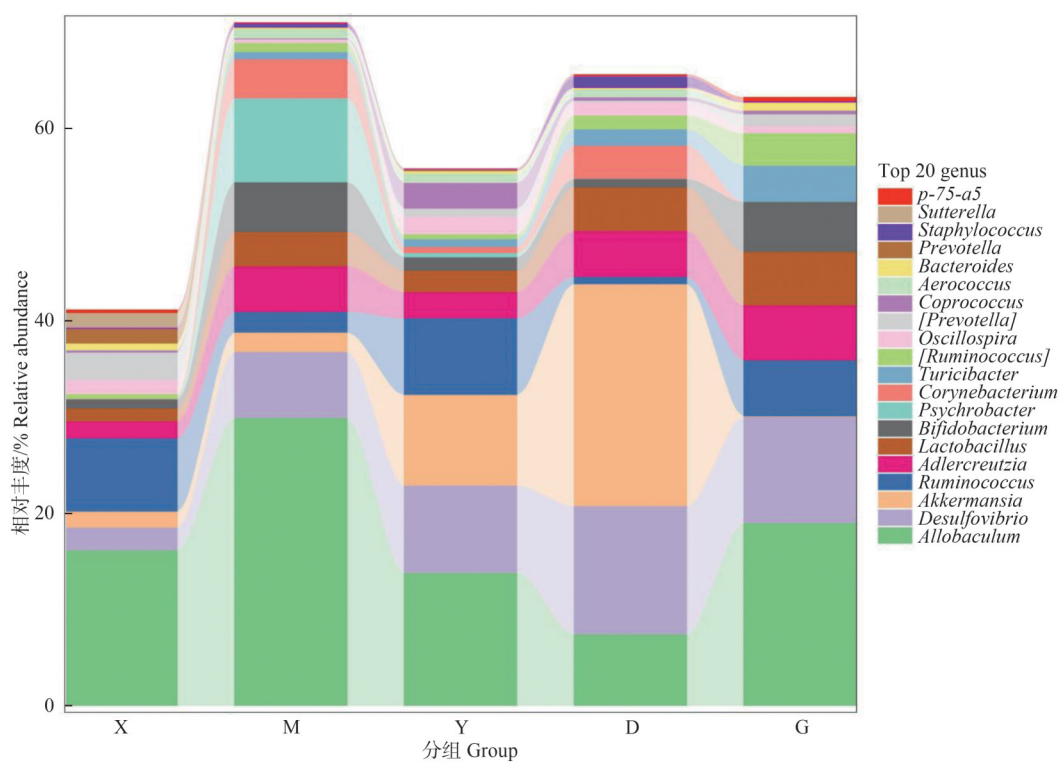


图 10 肠道微生物在属水平的组成及分布

Fig. 10 Composition and distribution of intestinal microorganisms at genus level

有的 Pathway 中有 78% 富集于与代谢相关的 11 个通路中,表明本试验中各组小鼠的肠道菌群相对丰度主要集中在代谢水平,如氨基酸代谢、能量代谢及糖类代谢等,表明本实验中的肠道菌群与肝脂代谢密切相关。

2.5.5 差异菌群筛选

LEfSe (LDA Effect Size)可以更好地理解不同的生态环境,它可以更清楚地识别出每个生态环境中的不同个体,并且可以更准确地描述它们之间的差异。根据图 12 发现 47 个不同的菌株,这些菌株之间的明显区别是由其中的一个或多个字母来命名的。如图 12(b)所示,正常对照组的肠道微生物显著富集在拟杆菌门的不同种属的菌上包括 *p_Bacteroidetes*、*o_Bacteroidales*、*c_Bacteroidia*、*f_S24_7*, (LDA>4, $P<0.05$);模型组的肠道菌群显著富集在放线菌门(*p_Actinobacteria*)、假单胞菌(*o_Pseudomonadales*)、 γ -变形菌(*c_Gammaproteobacteria*)、莫拉菌属(*f_Moraxellaceae*)、嗜冷杆菌(*g_Psychrobacter*) (LDA>4, $P<0.05$);易善复组的肠道菌群显著富集在瘤胃球菌属(*g_Ruminococcus*)、微球菌属(*f_Micrococcaceae*), (LDA>4, $P<0.05$);低浓度

发酵乳干预组的肠道菌群显著富集在疣微菌门的不同种属的菌上,包括 *p_Verrucomicrobia*、*o_Verrucomicrobiales*、*c_Verrucomicrobiae*、*g_Akkermansia*,高浓度发酵乳干预组的肠道菌群显著富集在厚壁菌门(*p_Firmicutes*) (LDA>4, $P<0.05$)。上述结果表明拟杆菌门主要存在于正常小鼠的肠道菌群中,易善复和发酵乳的干预极大的降低了有害菌如假单胞菌、 γ -变形菌等的丰度,提高了如瘤胃球菌属、疣微菌门和厚壁菌门等有益菌的丰度。

3 讨论

目前全球范围内不管是人类还是动物,过度肥胖已经成为了罹患很多慢性疾病的主要原因。超出正常范围内的体重增加、脂肪异常分布和异位脂质积累都会使得机体出现一系列病理变化,使机体面临肥胖并发症的风险^[12]。现有大量研究旨在寻找帮助提供降低肥胖率的方法,但每年的肥胖率依旧在持续增加^[13],因此依旧需要寻找更多预防或干预肥胖症及其引起的一系列疾病的策略。

根据最新研究表明,发酵乳制品不仅仅是一种口感酸甜的健康食品,而且还可以有效地预防肥

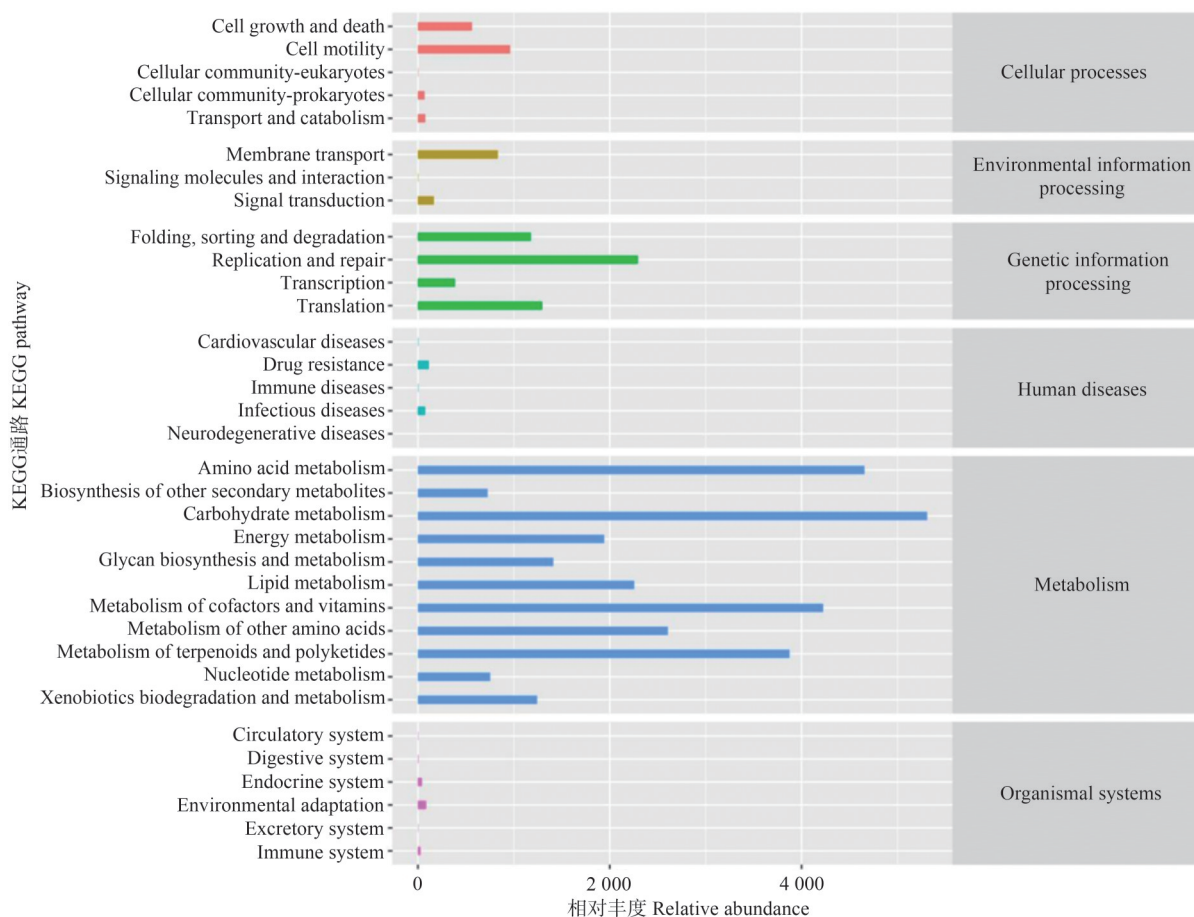


图 11 KEGG 二级功能通路丰度图

Fig. 11 KEGG secondary functional pathway abundance diagram

胖^[14],抑制脂肪变性,保护肝脏健康,调节肝脏糖代谢,降低肝脏的相对重量和TG水平,减少肝脏脂肪变性和纤维化的程度。通过对试验数据结果的分析可以得知,与正常对照组相比,模型组小鼠体重、LEE'S指数、ALT和AST均极显著提升,说明高脂喂养可以使小鼠体重极显著增加;与模型组相比发酵乳干预组小鼠体重、LEE'S指数、ALT和TC都极显著下降,其中AST和TG显著下降,而易善复组、低浓度发酵乳干预组和高浓度发酵乳干预组小鼠之间各项指标差异不显著,说明发酵乳能够显著改善肥胖小鼠的体重和肝脂代谢水平且与易善复无明显差异。基于以上内容可知发酵乳不仅能极显著降低肥胖小鼠的体重和LEE'S指数,而且对于小鼠的肝功能指标和血脂水平均有一定的改善作用,同时还能够使得肝组织脂肪变性有明显好转,基本没有明显的脂肪空泡。

Kondrashina等^[15]认为体重增长的抑制作用主要依靠发酵乳制品中的衍生肽酪蛋白刺激胃肠道

分泌更多的饱腹感激素来增加机体的饱腹感从而减少整体热量的摄入;Tunick等^[16]在2002年就指出脂质代谢对于机体健康的重要性,发酵乳制品主要通过筛选LAB菌株来达到抑制胰脂肪酶以此来调节脂质代谢。

其次,从对肥胖者肠道中Bacteroidetes和Firmicutes^[17]两大类细菌的丰度相关研究中可知肠道内这两大类细菌数量的增加与体重的减轻有关^[18];对基因肥胖小鼠的研究也表明,基因肥胖的小鼠的肠道微生物群落比瘦小的鼠具有更大的能量收集能力,这种能力可以通过将菌群接种到肠道内无该菌群的小鼠体内而进行传播^[19]。这些研究表明,与肥胖相关的肠道微生物群可能是一种生物标志物,也可能是一种靶点。基于上述分析结合本研究结果可以确定发酵乳制品的确对于肥胖小鼠的肠道菌群水平有一定的恢复作用,尤其是厚壁菌门和拟杆菌门。同时KEGG功能富集检验也表明本试验中的肠道菌群与肝脂代谢密切相关。然而

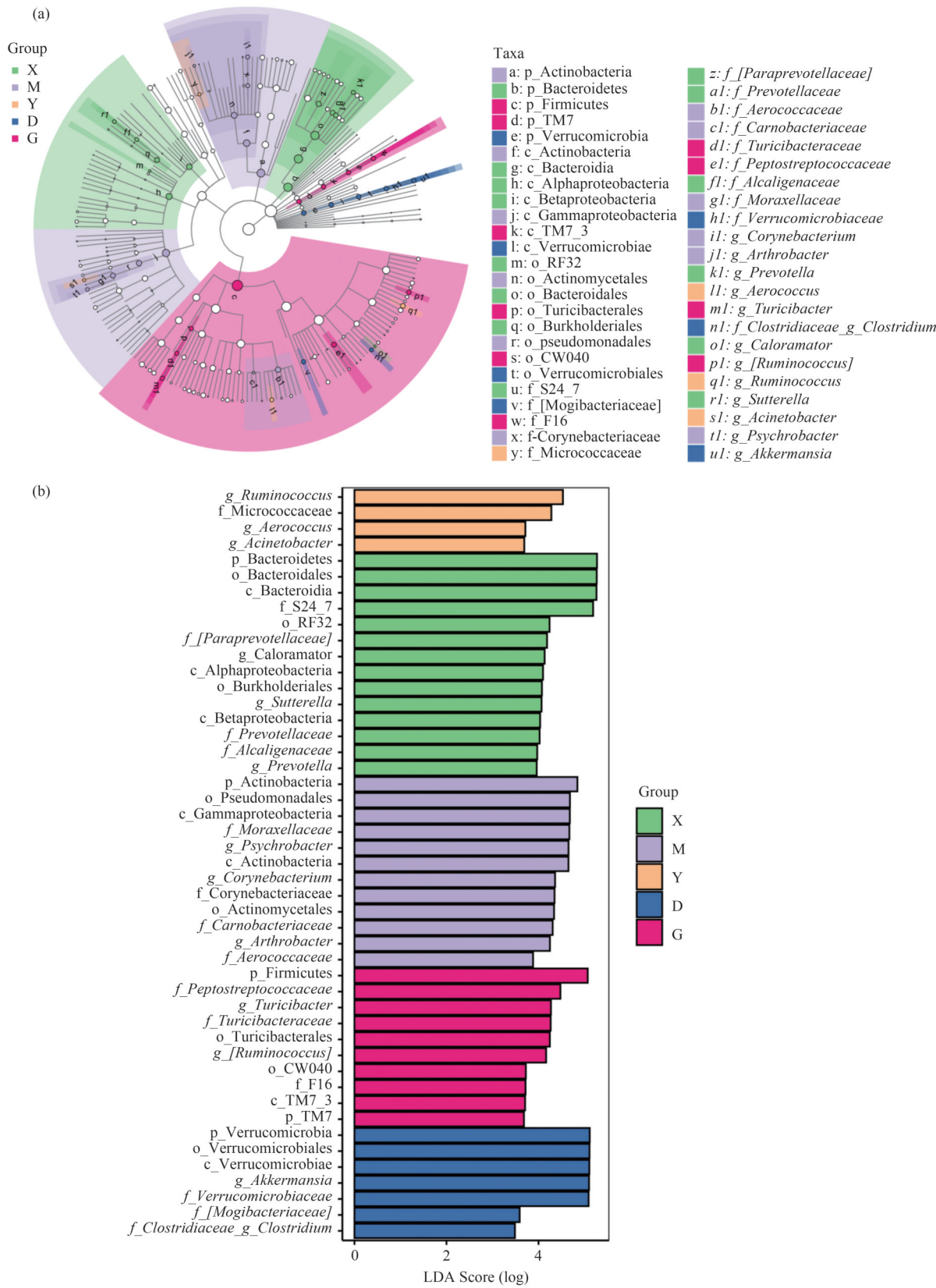


图 12 发酵乳对小鼠肠道菌群群落组成差异分析

Fig. 12 Differences of mice intestinal microbiota composition by adding the fermented milk

具体影响机制尚不清楚,需进一步深入探究原因,大多数研究者认为发酵乳制品发挥作用主要依靠益生菌如乳酸杆菌^[20]、嗜热链球菌^[21]、双歧杆菌^[22]、保加利亚乳杆菌^[23]和鼠李糖乳杆菌^[24]等来调节肠道微生物从而预防和改善肥胖,并通过一系列复杂反应来调节肝脂代谢。当然部分研究者考虑到了其他原因的存在,如 Mohammadi 等^[25]认为在肥胖的进展中起着关键作用的因素是肠道微生物菌群的失调。益生菌发酵奶制品(PFMP)通过影响肠道微生物群的功能,可能会对肥胖产生保护作用;而 Serquiz 等^[26]认为发酵乳制品之所以对肥胖产生作用是由于蛋白质的消化会产生肽,这些肽会引发肠道产生几个饱腹感信号,主要通过独立激活阿片样物质和 CCK-A 受体而有助于饱腹感从而减少摄入量。Park 等^[27]认为发酵乳制品抗脂肪生成的作用是由于其降低了脂肪细胞特异性基因表达水平,从而抑制了 3T3-L1 细胞向脂肪细胞分化。此外也有相关研究认为肥胖可能与炎性细胞因子的释放有关并会引起机体的氧化应激,反过来脂肪细胞因子的失调又会加剧炎症状态的发展,2014 年 Zarrati 等^[28]就研究了关于含有益生菌 *L. acidophilus* LA5, *L. casei* DN001 和 *Bifidobacterium lactis* BB12 的发酵乳制品对于 BMI 值的影响,结果表明发酵乳制品联合低热量饮食可显著降低体重、腰围和臀围($P < 0.05$)。此外,还观察到外周血单核细胞中促炎细胞因子的数量明显减少。

综上,发酵乳制品的确对肥胖引起的对肝脂病变和肠道菌群紊乱有着一定的改善作用。试验旨在为功能型发酵乳的开发提供理论依据,期望能够通过发酵乳制品在日常膳食中的预防和改善作用来减少肥胖患者的数量,控制我国肥胖率不断增长的趋势,造福因肝脂代谢不良罹患脂肪肝、肥胖、脂肪性肝炎等病症的人群,为社会谋取福祉。

4 结论

高脂喂养可以让小鼠体重极显著增加,在低浓度的发酵乳的作用下可以极显著的抑制肥胖小鼠体重增加,还可以极显著的改善其肝功能指数和血脂水平,对肥胖小鼠肠道菌群多样性有一定的调节作用。

参考文献 References

- [1] Tang D S, Bu T, Feng Q D, Liu Y H, Dong X F. Differences in overweight and obesity between the north and south of China [J]. *American Journal of Health Behavior*, 2020, 44(6): 780-793
- [2] Jastreboff A M, Kotz C M, Kahan S, Kelly A S, Heymsfield S B. Obesity as a disease: The obesity society 2018 position statement [J]. *Obesity*, 2019, 27(1): 7-9
- [3] 傅婧. 樟树籽仁油改善肥胖大鼠脂代谢紊乱的作用及机制[D]. 南昌: 南昌大学, 2016
Fu J. Effects and mechanisms of *Cinnamomum camphora* seed kernel oil on improving lipid metabolic disorders in obesity rats [D]. Nanchang: Nanchang University, 2016 (in Chinese)
- [4] Dong T S, Luu K, Lagishetty V, Sedighian F, Woo S L, Dreskin B W, Katzka W, Chang C, Zhou Y, Arias-Jayo N, Yang J, Ahdoon A, Li Z P, Pisegna J R, Jacobs J P. A high protein calorie restriction diet alters the gut microbiome in obesity [J]. *Nutrients*, 2020, 12(10): 3221
- [5] Liu R X, Hong J, Xu X Q, Feng Q, Zhang D Y, Gu Y Y, Shi J, Zhao S Q, Liu W, Wang X K, Xia H H, Liu Z P, Cui B, Liang P W, Xi L Q, Jin J B, Ying X Y, Wang X Y, Zhao X J, Li W Y, Jia H J, Lan Z, Li F Y, Wang R, Sun Y K, Yang M L, Shen Y X, Jie Z Y, Li J H, Chen X M, Zhong H Z, Xie H L, Zhang Y F, Gu W Q, Deng X X, Shen B Y, Xu X, Yang H M, Xu G W, Bi Y F, Lai S H, Wang J, Qi L, Madsen L, Wang J Q, Ning G, Kristiansen K, Wang W Q. Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention [J]. *Nature Medicine*, 2017, 23(7): 859-868
- [6] Manzanarez-Quin C G, Beltrán-Barrientos L M, Hernández-Mendoza A, González-Córdova A F, Vallejo-Córdoba B. Invited review: Potential antiobesity effect of fermented dairy products [J]. *Journal of Dairy Science*, 2021, 104(4): 3766-3778
- [7] Wang H B, Yu Z T, Gao Z B, Li Q W, Qiu X J, Wu F, Guan T C, Cao B H, Su H W. Effects of compound probiotics on growth performance, rumen fermentation, blood parameters, and health status of neonatal Holstein calves [J]. *Journal of Dairy Science*, 2022, 105(3): 2190-2200
- [8] 周玉. 老年小鼠肠道菌群通过改善多巴胺能神经系统和诱导神经发生发挥对帕金森小鼠的保护作用[D]. 无锡: 江南大学, 2022
Zhou Y. Gut microbiota of aged mice exerts protective effect on Parkinson's disease mice by improving dopaminergic nervous system and inducing neurogenesis [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022 (in Chinese)
- [9] Cho S H, Cho Y J, Park J H. The human symbiont *Bacteroides thetaiotaomicron* promotes diet-induced obesity by regulating host lipid metabolism [J]. *Journal of Microbiology*, 2022, 60(1): 118-127
- [10] 郑雨微, 于浪潮, 夏士杰, 何雨曦, 吕红明. 异鼠李素对 6-羟基多巴胺诱导的神经元细胞毒性的影响及氧化损伤的保护作用 [J]. 中国农业大学学报, 2023, 28(11): 140-150
Zheng Y W, Yu L C, Xia S J, He Y X, Lu H M. Effect of isorhamnetin on 6-hydroxydopamine-induced neuronal cytotoxicity and protection against oxidative injury [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2023, 28(11): 140-150 (in Chinese)
- [11] Coelho A A, Carvalho R R, Muniz A L, Crispim A A, Meneses A M, Silva C, Paula D S, Alves A, Sousa F B, Silva P G B. CD20⁺ cells

- blockage by rituximab delays wound healing in oral traumatic ulcers in rats [J]. *Archives of Oral Biology*, 2024, 157: 105844
- [12] Purnell J Q. What is obesity? Definition as a disease, with implications for care[J]. *Gastroenterology Clinics of North America*, 2023, 52(2): 261-275
- [13] 2015 Obesity Collaborators GBD, Afshin A, Forouzanfar M H, Reitsma M B, Sur P, Estep K, Lee A, Marczak L, Mokdad A H, Moradi-Lakeh M, Naghavi M, Salama J S, Vos T, Abate K H, Abbafati C, Ahmed M B, Al-Aly Z, Alkerwi A, Al-Raddadi R, Amare A T, Amberbir A, Amegah A K, Amini E, Amrock S M, Anjana R M, Ärnlöv J, Asayesh H, Banerjee A, Barac A, Baye E, Bennett D A, Beyene A S, Biadgilign S, Biryukov S, Bjertness E, Boneya D J, Campos-Nonato I, Carrero J J, Cecilio P, Cerci K, Ciobanu L G, Cornaby L, Damte S A, Dandona L, Dandona R, Dharmaratne S D, Duncan B B, Eshrati B, Esteghamati A, Feigin V L, Fernandes J C, Fürst T, Gebrehiwot T T, Gold A, Gona P N, Goto A, Habtewold T D, Hadush K T, Hafezi-Nejad N, Hay S I, Horino M, Islami F, Kamal R, Kasaeian A, Katikireddi S V, Kengne A P, Kesavachandran C N, Khader Y S, Khang Y H, Khubchandani J, Kim D, Kim Y J, Kinfu Y, Kosen S, Ku T, Defo B K, Kumar G A, Larson H J, Leinsalu M, Liang X F, Lim S S, Liu P, Lopez A D, Lozano R, Majeed A, Malekzadeh R, Malta D C, Mazidi M, McAlinden C, McGarvey S T, Mengistu D T, Mensah G A, Mensink G B M, Mezgebe H B, Mirakhimov E M, Mueller U O, Noubiap J J, Obermeyer C M, Ogbo F A, Owolabi M O, Patton G C, Pourmalek F, Qorbani M, Rafay A, Rai R K, Ranabhat C L, Reinig N, Safiri S, Salomon J A, Sanabria J R, Santos I S, Sartorius B, Sawhney M, Schmidhuber J, Schutte A E, Schmidt M I, Sepanlou S G, Shamsizadeh M, Sheikhbahaei S, Shin M J, Shiri R, Shiue I, Roba H S, Silva D A S, Silverberg J I, Singh J A, Stranges S, Swaminathan S, Tabarés-Seisdedos R, Tadese F, Tedla B A, Tegegne B S, Terkawi A S, Thakur J S, Tonelli M, Topor-Madry R, Tyrovolas S, Ukwaja K N, Uthman O A, Vaezghasemi M, Vasankari T, Vlassov V V, Vollset S E, Weiderpass E, Werdecker A, Wesana J, Westerman R, Yano Y, Yonemoto N, Yonga G, Zaidi Z, Zenebe Z M, Zipkin B, Murray C J L. Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2017, 377(1): 13-27
- [14] Dror T, Dickstein Y, Dubourg G, Paul M. Microbiota manipulation for weight change[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 106: 146-161
- [15] Kondrashina A, Brodkorb A, Giblin L. Dairy-derived peptides for satiety [J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 66: 103801
- [16] Tunick M H, Van Hekken D L. Dairy products and health: Recent insights [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(43): 9381-9388
- [17] Koliada A, Syzenko G, Moseiko V, Budovska L, Puchkov K, Perederiy V, Gavalko Y, Dorofeyev A, Romanenko M, Tkach S, Sineok L, Lushchak O, Vaiserman A. Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population[J]. *BMC Microbiology*, 2017, 17(1): 120
- [18] Liu J, Zhen D Y, Hu C B, Liu Y W, Shen X R, Fu P C, He Y F. Reconfiguration of gut microbiota and reprogramming of liver metabolism with phycobiliproteins bioactive peptides to rehabilitate obese rats [J]. *Nutrients*, 2022, 14(17): 3635
- [19] Murphy E F, Cotter P D, Healy S, Marques T M, O'Sullivan O, Fouhy F, Clarke S F, O'Toole P W, Quigley E M, Stanton C, Ross P R, O'Doherty R M, Shanahan F. Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: Relationship to diet, obesity and time in mouse models[J]. *Gut*, 2010, 59(12): 1635-1642
- [20] de Moura E Dias M, da Silva Duarte V, Mota L F M, de Cássia Ávila Alpino G, Dos Reis Louzano S A, da Conceição L L, Mantovanie H C, Pereira S S, Oliveira L L, de Oliveira Mendes T A, Porcellato D, do Carmo Gouveia Peluzio M. *Lactobacillus gasseri* LG-G12 restores gut microbiota and intestinal health in obesity mice on ceftriaxone therapy [J]. *Foods*, 2023, 12(5): 1092
- [21] Chen Y, Feng R N, Yang X, Dai J X, Huang M, Ji X N, Li Y, Okekunle A P, Gao G H, Onwuka J U, Pang X Y, Wang C, Li C L, Li Y, Sun C H. Yogurt improves insulin resistance and liver fat in obese women with nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome: A randomized controlled trial[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2019, 109(6): 1611-1619
- [22] Gong H L, Gao H N, Ren Q Y, He J. The abundance of bifidobacterium in relation to visceral obesity and serum uric acid[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 13073
- [23] Nagashimada M, Honda M. Effect of microbiome on non-alcoholic fatty liver disease and the role of probiotics, prebiotics, and biogenics [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(15): 8008
- [24] Yang M, Zheng J P, Zong X R, Yang X Y, Zhang Y, Man C X, Jiang Y J. Preventive effect and molecular mechanism of *Lactobacillus rhamnosus* JLI1 on food-borne obesity in mice[J]. *Nutrients*, 2021, 13(11): 3989
- [25] Mohammadi H, Ghavami A, Faghihimani Z, Sharifi S, Nattagh-Eshdivani E, Ziaei R, Miraghajani M. Effects of probiotics fermented milk products on obesity measure among adults: A systematic review and meta-analysis of clinical trials[J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 82: 104494
- [26] Serquiz A C, Machado R J A, Serquiz R P, Lima V C O, de Carvalho F M C, Carneiro M A A, Maciel B L L, Uchôa A F, Santos E A, Morais A H A. Supplementation with a new trypsin inhibitor from peanut is associated with reduced fasting glucose, weight control, and increased plasma CCK secretion in an animal model [J]. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2016, 31(6): 1261-1269
- [27] Park D Y, Ahn Y T, Huh C S, Jeon S M, Choi M S. 2011. The inhibitory effect of *Lactobacillus plantarum* KY1032 cell extract on the adipogenesis of 3T3-L1 cells [J]. *Journal of Medicinal Food*, 2011, 14(6): 670-675
- [28] Zarrati M, Salehi E, Nourijelyani K, Mofid V, Zadeh M J H, Najafi F, Ghaflati Z, Bidad K, Chamari M, Karimi M, Shidfar F. Effects of probiotic yogurt on fat distribution and gene expression of proinflammatory factors in peripheral blood mononuclear cells in overweight and obese people with or without weight-loss diet [J]. *Journal of the American College of Nutrition*, 2011, 33(6): 417-425

责任编辑: 秦梅



第一作者简介：李昊霞，中国农业大学在读硕士研究生，主要从事兽医内科学与诊断学方向。本科毕业于安徽农业大学动物医学专业，曾多次获得校级奖学金，获国家发明专利2项，多次在A类创新创业大赛中荣获省级奖项。



通讯作者简介：李玉，安徽农业大学副教授，硕士生导师，主要从事动物营养代谢病与中毒病研究。中国畜牧兽医学会高级会员，兽医内科与临床诊疗学分会理事，动物毒物学分会理事，动物福利与健康养殖分会理事，美国奶业科学学会会员，安徽省奶业协会秘书。主持国家自然科学基金面上项目(32172924, 31873029)、国家自然科学基金青年项目(31502136)、安徽省自然科学基金青年项目(1608085QC56)、安徽省重点研发和开发计划项目(1804g07020187)等9项；荣获省部级科研成果二等奖1项，安徽省教学成果二等奖1项，市厅级教学成果二等奖1项；授权国家发明专利1项，授权实用新型专利5项；获得软件著作权4项；发表科技论文150余篇，其中SCI科技论文50余篇。