

骆驼乳对慢性酒精性肝损伤小鼠肠道菌群的影响

白路平¹, 乔向宇¹, 海勒¹, 其布勒¹, 吉日木图^{1,2}, 明亮^{1,2*}

¹内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 呼和浩特 010018

²内蒙古骆驼研究院 内蒙古阿拉善 750306)

摘要 目的: 探究骆驼乳对慢性酒精性肝损伤小鼠肠道菌群多样性及结构的影响。将雄性 C57BL/6Ncr 小鼠随机分为 4 组: 对照组(Con, n=6)、模型组(Et, n=6)、骆驼乳剂量组(EtCM, n=6)和牛乳剂量组(EtNM, n=6); 实验期为 8 周, 前 4 周饲喂 Lieber-DeCarli 液体饲料(含对照), 后 4 周在饲喂 Lieber-DeCarli 液体饲料的基础上, 灌胃相应的乳或生理盐水。灌胃结束后, 按照 5 g/kg 剂量一次性灌胃 31.5% 酒精溶液, 建立 NIAAA 模型。检测血清 LPS 含量, 并在无菌条件下取小鼠结肠粪便, 进行 16S rRNA 测序, 分析肠道菌群 α 多样性、 β 多样性及基于门、属水平的物种结构。血清指标结果显示, EtCM 组和 EtNM 组小鼠血清 LPS 显著降低($P < 0.01$)。16S rRNA 测序结果表明, 骆驼乳和牛乳能显著提高 ALD 小鼠结肠肠道菌群的丰度和均匀度, 更好地调整肠道菌群结构, 其中骆驼乳较牛乳显示出更好的 α 多样性。在门水平上, 骆驼乳和牛乳显著提高拟杆菌门的丰度, 降低厚壁菌门的丰度。在属水平上, 骆驼乳和牛乳显著提高副拟杆菌属、拟杆菌属、阿克曼菌属的丰度, 降低瘤胃菌科下的未知属 *Ruminococcaceae_UCG-013* 丰度。其中, 骆驼乳的有益菌丰度较牛乳高出 9%。结论: 骆驼乳通过改变 ALD 小鼠肠道菌群环境, 来调节肠道菌群结构, 可作为调节肠道菌群的功能性乳制品, 可预防慢性 ALD 引起的肠道屏障功能障碍。

关键词 骆驼乳; 16S rRNA; 慢性酒精性肝损伤; 肠道菌群

文章编号 1009-7848(2022)01-0078-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.01.009

骆驼乳是营养价值很高的饮品, 因富含维生素、矿物质、微量元素, 低过敏原以及耐贮藏等特性, 而受到人们的喜爱。骆驼乳还富含乳铁蛋白、溶菌酶、免疫球蛋白等, 具有抗微生物的作用^[1]。近年来, 有文献报道, 与其它乳类相比, 骆驼乳中的微生物含量最高, 达到 10^5 CFU/mL^[2], 并且其具有改善肠道内微生物平衡, 促进营养物质吸收的作用^[3]。XU 等^[4]研究发现蒙古国骆驼乳中分离出的副干酪杆菌亚种具有成为益生菌的潜力, 推测该菌可作为肝损伤抑制剂, 用于基于代谢异常和炎症应答的肝病干预, 说明骆驼乳可作为调节肠道菌群的功能性乳制品。

酒精性肝病(Alcoholic liver disease, ALD)是全世界较常见的可预防疾病之一, 每年诊断为 ALD 患者有上百万人, 并且全球死亡人数中约 6% 是由 ALD 引起的^[5]。戒酒是 ALD 患者的首要治疗措施, 可防止 ALD 患者发生进一步的病变^[6]。有研究表明, 长期大量饮酒会造成肠道屏障功能障碍^[7], 增加肠道通透性, 使微生物产物脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)易位到血液和肝脏中^[8], 引发炎症反应, 并与乙醇诱导的肝毒性产生协同作用, 从而导致脂肪变性, 造成 ALD^[9]。Ming 等^[10]研究表明骆驼乳通过调节 ALD 小鼠肠道菌群来减轻肝脏炎症应答, 发挥其保肝作用。以上研究表明, 肠道菌群与 ALD 发病机制密切相关, 通过靶向肠道菌群的治疗可能对 ALD 有效。表征 ALD 共生微生物组的结构, 鉴定饮酒后产生的微生物组的变化, 以及探讨骆驼乳对 ALD 微生物多样性及物种结构的影响具有重大意义。

本实验以骆驼乳为原料, 使用 NIAAA 模型诱发慢性 ALD 小鼠为研究对象, 研究骆驼乳对慢性酒精性肝损伤小鼠肠道菌群多样性及其结构的影响, 以期对骆驼乳益生菌的开发提供理论依据。

收稿日期: 2020-12-30

基金项目: 国家重点研发计划项目(2020YFE0203300); 内蒙古自治区科技成果转化专项(AMCG201911); 高层次人才引进科研启动项目(NDYB2017-28); 双一流学科创新团队建设(NDSC2018-14); 内蒙古自然科学基金项目(2018BS03017)

作者简介: 白路平(1994—), 女, 硕士生

通信作者: 明亮 E-mail: bmlimau@163.com

1 材料与方法

1.1 动物与材料、试剂

SPF 级雄性 C57BL/6N_{Gr} 小鼠,北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2016-0006。饲养于 IVC 动物实验系统内,室温 20~25 ℃,相对湿度 50%~60%,昼夜交替周期为 12 h。

骆驼乳,采自内蒙古自治区巴彦淖尔市牧区;Lieber-DeCarli(Lieber-DeCarli,LDC)液体饲料,南通特洛非饲料科技有限公司,生产许可证号:苏饲证(2014)06092。

小鼠脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)ELISA 试剂盒,上海酶联生物科技有限公司;无水 CH₃CH₂OH(GR),国药集团化学试剂有限公司;E. Z.N.A.[®] Soil DNA 抽提试剂盒,美国 Omega Bio-Tek 公司;MiSeq 测序试剂盒,美国 Illumina 公司;FastPfu Polymerase AxyPrep DNA Gel Extraction 试剂盒,美国 Axygen 公司;建库试剂盒,美国 Bio Scientific 公司。

1.2 仪器与设备

真空冷冻干燥机(2014-18Ab),上海东 Omega Bio-Tek 富龙科技股份有限公司;台式高速冷冻离心机(5810R),美国 Eppendorf 公司;多功能微孔板检测仪(Synergy H1),美国 BioTek 公司;Richter

喂养管,南通特洛非饲料科技有限公司;医用低温保存箱(DW-88L388J),青岛海尔特种电器有限公司;电热鼓风干燥箱(DHG-9030A)、电热恒温水槽(DK-8AXX),上海一恒科学仪器有限公司;立式压力蒸汽灭菌器(SQ510C),上海申安医疗器械厂;洁净工作台(SW-CJ-2FD),北京东联哈尔仪器制造厂;超微量分光光度计(NanoDrop2000),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;电泳仪(DYY-6C),北京市六一仪器厂;PCR 仪(ABI GeneAmp[®] 9700),美国 ABI 公司;测序仪(Illumina Miseq),美国 Illumina 公司。

1.3 方法

1.3.1 分组与取样

1) 动物实验 小鼠适应性饲喂 1 周后,将 24 只小鼠随机分为 4 组,对照组(Con, $n=6$)、模型组(Et, $n=6$)、骆驼乳剂量组(EtCM, $n=6$)和牛乳剂量组(EtNM, $n=6$)。每组所饲喂饲料和实验处理如表 1 所示。分组后单笼饲养,专用 Richter 喂养管给食,饲喂量 30 mL/只·d。开始实验后,除液体饲料外,不再单独给水。实验共进行 8 周,前 4 周仅饲喂专用饲料,不进行灌胃操作;后 4 周饲喂方式不变,灌胃给乳或生理盐水,每日灌胃 1 次,灌胃体积 0.3 mL。

表 1 每组所饲喂饲料和实验处理

Table 1 Feed and experimental treatments for each group

组别	简称	动物数量	是否过渡喂养	饲料(第 2~9 周)	灌胃实验
对照组	Con	6	否	LDC 对照液体饲料	生理盐水,0.3 mL
模型组	Et	6	是	LDC 酒精液体饲料	生理盐水,0.3 mL
骆驼乳剂量组	EtCM	6	是	LDC 酒精液体饲料	生驼乳,剂量 3 g/kg
牛乳剂量组	EtNM	6	是	LDC 酒精液体饲料	生牛乳,剂量 3 g/kg

2) 造模 参考 Bertola 等^[1]的研究方法,建立 NIAAA 模型(图 1)。第 1 周采用过渡饲喂法^[2],第 2~9 周开始,造模组连续接受 8 周的 4%LDC 酒精液体饲料饲喂,对照组喂等热量 LDC 对照液体饲料。造模组在结束液体饲料饲喂后的第 2 天,按照 5 g/kg 剂量一次性灌胃体积分数 31.5%的酒精溶液,对照组灌胃等热量的麦芽糖糊精溶液。

造模结束后,异氟烷麻醉小鼠,眼眶采血,颈

椎脱臼法处死小鼠,并在无菌操作台上收集小鼠结肠部粪便,保存于灭菌后的 EP 管中,液氮速冻后保存于-80 ℃冰箱。样本分组情况如表 2 所示。

1.3.2 血清指标检测 血液常温下静置 4 h 后,低温离心(4 ℃, 3 000 r/min, 25 min)分离血清,按照 ELISA 试剂盒说明书的方法检测血清中 LPS 的含量(EU/L)。

1.3.3 小鼠肠道菌群分析



图1 NIAAA造模图

Fig.1 NIAAA modeling diagram

1.3.3.1 小鼠微生物群落多样性测序实验过程

将小鼠粪便从 -80°C 冰箱取出后,快速放入干冰内送至上海美吉生物医药科技有限公司测序。实验过程如下:

1) E.Z.N.A.[®] Soil DNA 抽提试剂盒随机提取部分小鼠粪便中的DNA,以 338F (5'-ACTCC TACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GCAC TACHVGGGTWTCTAAT-3') 为引物,进行 PCR 预实验,扩增 16S rRNA 基因的 V3-V4 区域。并用 NanoDrop2000 超微量分光光度计和 2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物的质量和浓度以及完整性。扩增出浓度合适的产物后,进行正式实验。

2) PCR 正式实验采用 TransGen AP221-02: TransStart FastPfu DNA Polymerase, 20 μL 反应体系: 4 μL 的 5 \times FastPfu Buffer, 2 μL 2.5 mmol/L dNTPs, 上、下引物各 0.8 μL , 0.4 μL FastPfu Polymerase, 0.2 μL BSA, 10 μL Template DNA, 最后加 ddH₂O 至 20 μL 。PCR 反应参数如表 3 所示。

3) 按照 1.3.3.1(1)节的方法检测 PCR 产物的质量和浓度及完整性,并用 FastPfu Polymerase AxyPrep DNA Gel Extraction 试剂盒回收 PCR 产物。用酶标仪检测 PCR 产物定量。用 NEXTFLEX Rapid DNA-Seq 试剂盒构建 MiSeq PE 文库。最后用 Illumina Miseq PE 300 平台进行高通量测序。

1.3.3.2 生物学信息分析 MiSeq 测序得到的是双端序列数据,并优化数据。首先通过 PE reads 和 overlap 的关系,将成对 reads 拼接(merge)成一条序列,同时对 reads 的质量和 merge 的效果进行质控过滤;其次,根据序列首尾两端的 barcode 和引物序列区分样品,最后得到优化序列。基于优化序列进行 OTU 聚类之后与 Silva 16S rRNA 数据库(v132)进行序列对比,并采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 97%相似水平的 OTU 代表序列进行

表2 小鼠结肠粪便样本信息

Table 2 Mice colon stool sample information

组别	样本名称	样本量 (n)
Con	Con0111 Con0112 Con0121	6
	Con0032 Con0113 Con0043	
Et	Et0202 Et0222 Et0231	6
	Et0233 Et0212 Et0132	
EtCM	EtCM0312 EtCM0311 EtCM0221	6
	EtCM0321 EtCM0242 EtCM0332	
EtNM	EtNM0442 EtNM1001 EtNM1002	6
	EtNM1003 EtNM1011 EtNM1033	

表3 PCR 反应参数

Table 3 PCR reaction parameters

	温度/ $^{\circ}\text{C}$	时间	次数
预变性	95	3 min	1
扩增过程			
引物变性	95	30 s	30
引物退火	55	30 s	
引物延伸	72	42 s	
最后延伸			
	72	10 min	

物种鉴定和注释。根据分类学统计结果,实验一方面评估本次测序样本量是否足够,另一方面通过 Alpha 多样性统计各 OTU 注释结果在每个样本中对应的丰度信息;之后进行 Beta 多样性分析,得到不同样本间菌群结构差异及各类水平上的物种结构信息。

1.4 数据处理

Alpha 多样性指数数据使用 Wilcoxon 秩和检验进行分析之后,用 Graphpad prism 7 软件进行绘图。与正常组比较,*. $P<0.05$,**. $P<0.01$;与模型组比较,#. $P<0.05$,##. $P<0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 骆驼乳对慢性酒精性肝损伤小鼠血清 LPS 含量的影响

由图 2 所示,与 Con 组相比较,Et 组小鼠血清中 LPS 含量显著升高($P<0.01$),说明酒精导致小鼠肠道粘膜损伤,使肠道菌群发生定量和定性改变(即小肠细菌过度生长和营养不良),肠道通透性增加,从而导致细菌 LPS 易位至门脉血流^[13]。与 Et 组相比较,EtCM 和 EtNM 组小鼠血清中 LPS 的含量显著降低($P<0.01$),其中 EtCM 组小鼠血清中 LPS 含量小于 Con 组小鼠。实验结果表明骆驼乳可以预防酒精引起的结肠功能障碍,能够抑制血清中 LPS 的含量的升高。

2.2 α 多样性分析

长期大量饮酒会降低细菌多样性。通过 α 多样性来检查 OTU 数量^[14], α 多样性是度量单个样本中微生物群落的丰度和均匀度的指标^[15]。本实验采用 ACE 指数、Chao 指数、Shannon 指数、Simpson 指数、Coverage 指数和稀释曲线来评估单个样本的 α 多样性。

采用对有效序列进行随机抽样的方法绘制稀释曲线,以抽到的序列数与它们对应的 OTU 数目

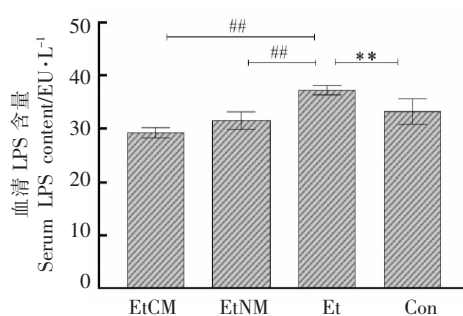


图 2 骆驼乳对慢性酒精性肝损伤引起的小鼠血清中 LPS 含量的影响

Fig.2 Effect of camel milk on changes in LPS content in serum of mice caused with chronic alcoholic liver injury

构建稀释曲线,并用 mothur 计算不同随机抽样下的 α 多样性指数,利用 R 语言工具制作曲线图^[16]。如图 3 结果所示,在 OTU 水平上,小鼠肠道菌群的多样性指数 Sobs 稀释曲线趋于平坦(图 3a),说明本次测序数据量合理,增加数据量只会产生少量新的 OTU。并且小鼠肠道菌群的多样性指数 Shannon 稀释曲线也趋于平坦(图 3b),说明测序数据量足够大,可以反映样本中绝大多数的微生物多样性信息。

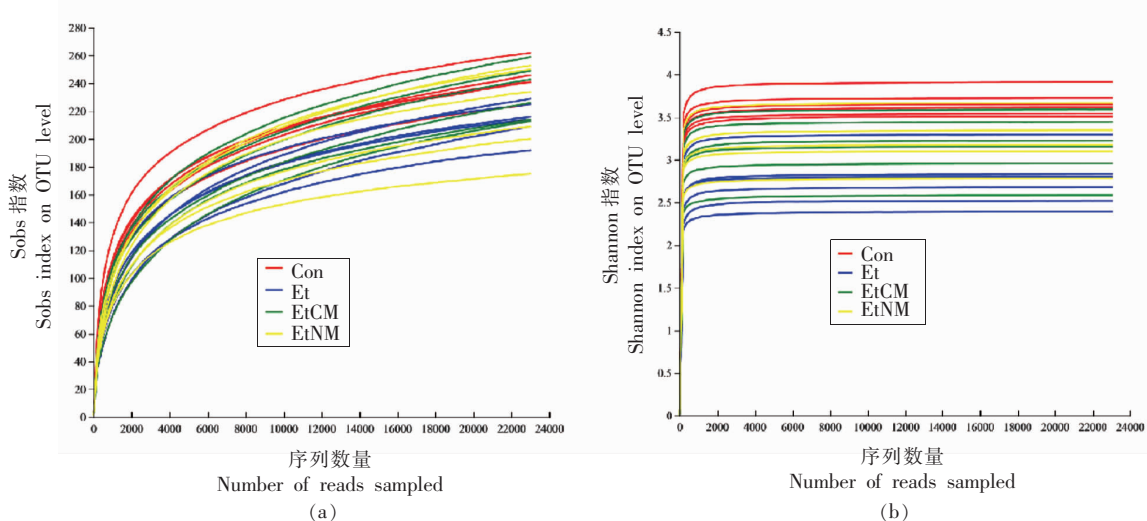


图 3 基于 Sobs 指数与 Shannon 指数的稀释曲线图

Fig.3 Dilution curve based on Shannon index and Sobs index

ACE 和 Chao 指数反映样本中所含微生物群落丰度。而 Shannon 和 Simpson 指数反映样本中所含微生物群落丰度和均匀度两方面评估^[15]。

Coverage 指数反映样本中所含微生物群落的覆盖度^[17]。由图 4 结果可知,每个样本的 Coverage 值均为 0.997 以上,表明测序深度良好,覆盖率高,可

以真实反映样本中微生物群落状况(图 4a)。根据 ACE(图 4b)和 Chao(图 4c)指数结果可知,Et 组小鼠粪便微生物丰度显著降低,而 EtCM 组小鼠粪便微生物丰度显著升高。并且根据 Shannon(图 4d)和 Simpson(图 4e)指数结果显示,Et 组小鼠粪

便微生物群落均匀度显著降低,而 EtCM 组小鼠粪便微生物群落均匀度呈上上升趋势。以上结果表明,虽然 EtCM 组小鼠粪便微生物群落均匀度略低,但是有更高的丰度,表现出比其它组较高的多样性。

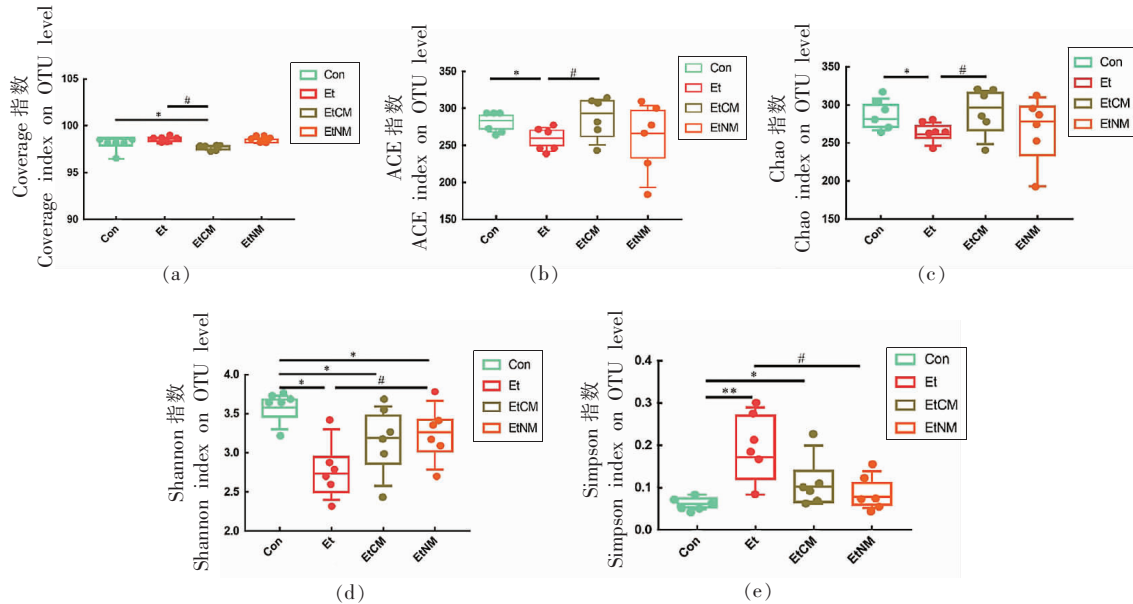


图 4 基于 OTU 总数的 α 多样性指数图

Fig.4 α -Diversity indexes based on the total number of OTUs

2.3 各组在 OTU 水平上的 Venn 图分析

Venn 图可用于统计多组或多个样本中所共有和独有的物种(如 OTU)数目,可以直观展现不同组样本中物种(如 OTU)结构相似性及重叠情况^[18]。由图 5 可知,4 组样本中共检验出 1 413 个 OTU。EtCM 组样本 OTU 数量最多,达到 370 个,其次是 Con 组,OUT 数为 357 个;EtNM 组和 Et 组 OUT 数分别为 345 个和 341 个。长期大量饮酒,导致小鼠 OTU 数量有所降低,这可能由于饮酒使小鼠肠道菌群失调,影响肠道菌群结构^[14]。经骆驼乳干预处理后,小鼠 OTU 数量显著增加,并且较 Con 组小鼠 OTU 数量高出 13 个。表明骆驼乳可以显著提高小鼠粪便微生物群落的多样性。该结果与 α 多样性结果相一致。从维恩图(图 5)进一步得出,4 组共有 OTU 数为 258 个,Con、Et、EtCM 和 EtNM 组独有的 OTU 数分别为 99,83,112,87 个,分别占各组总 OTU 数的 27.73%,24.34%,30.27%

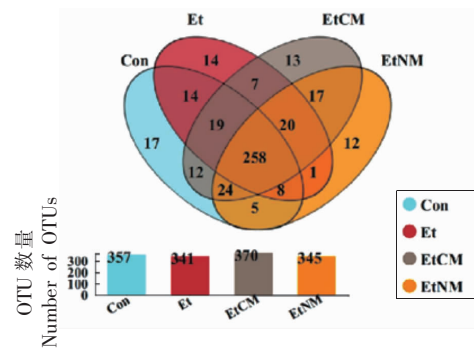


图 5 各组微生物群落 OTU 水平的 Venn 图

Fig.5 Venn diagram of OTU level of microbial communities in each group

和 25.22%。

2.4 β 多样性分析

β 多样性是度量样本间微生物群落结构相似度的指标。PCoA 分析法用来考察和区分样本间的菌群结构差异,是 β 多样性分析方法之一。通过 β

多样性分析可以确定不同组间微生物群落是否存在差异^[9]。由图 6 所示,每组样本点分散区域比较密集,表明组内差异较小,微生物群落结构相似。根据 $P < 0.001$, 表明组间差异很大,Con、Et、EtCM 和 EtNM 组能很好地区分开来(图 6a),说明酒精

和骆驼乳以及牛乳对小鼠的微生物群落有显著影响。而 EtCM 组和 EtNM 组的组间差异很小,两组小鼠肠道菌群结构上无显著差异 ($P > 0.05$)(图 6b)。

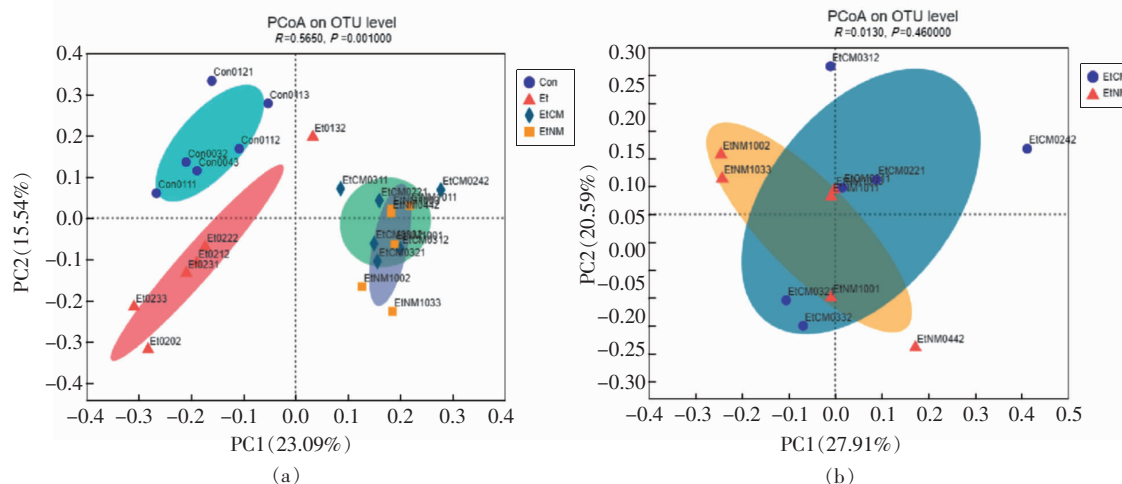


图 6 小鼠肠道菌群与 PCoA 分析图

Fig.6 Analysis of mouse intestinal community and PCoA

根据 α 多样性和 β 多样性分析,可以确定本次实验测序数据量足够大,可以反映样本中绝大多数微生物多样性信息;其中 EtCM 组小鼠粪便微生物群落 α 多样性最高,而 Et 组小鼠粪便微生物群落 α 多样性最低。

通过 PCoA 分析,发现 Con 与 Et 组小鼠肠道菌群结构上有显著差异,表明酒精使小鼠肠道菌群结构发生了明显变化。经骆驼乳和牛乳干预处理后,发现 Et 与 EtCM 组和 EtNM 组小鼠肠道菌群结构上有显著差异,说明骆驼乳和牛乳能在一定程度上改变小鼠肠道菌群环境,调节小鼠肠道菌群结构。此外,研究发现 EtCM 组和 EtNM 组小鼠肠道菌群结构上无显著差异。Morrin 等^[20]研究发现牛乳可以直接调节肠道细胞表面,并可能改变细胞的糖基化状态,进而促进不同细菌群落,如双歧杆菌(*Bifidobacterium*)的黏附。Morrin 等^[21]研究发现牛乳中的免疫球蛋白 G 刺激肠道上皮细胞表面来增加双歧杆菌对肠上皮细胞的粘附。Zhao 等^[22]研究发现新鲜的骆驼乳具有较高的细菌多样性,并且是分离新型乳酸菌的宝贵天然资源。Ming 等^[10]研究表明骆驼乳通过调节 ALD 小鼠肠道菌群,来减轻肝脏炎症应答,发挥它的保肝作用。因

此骆驼乳与牛乳一样,通过改变肠道菌群的生存环境,调节肠道菌群的丰度,来调整菌群结构,促进有益菌在肠道内黏附,减少有害菌的增殖,并且防止乙醇对小鼠结肠内微生态平衡的破坏。

2.5 物种结构分析

2.5.1 基于门水平上的物种结构分析 物种结构分析采用统计学的分析方法,可得到各样本在各水平(域、界、门、纲、目、科、属、种、OTU 等)上含有哪些优势物种,以及各优势物种的相对丰度^[23]。本实验重点分析了门水平和属水平。

探究骆驼乳和牛乳对慢性 ALD 小鼠肠道菌群结构的影响。由图 7 可知,在门水平上,4 组细菌种类的相对丰度,检测到厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、脱铁杆菌门(Deferribacteres)等为小鼠结肠肠道中相对丰度较高的菌门,其中厚壁菌门和拟杆菌门的丰度最高,两者的相对丰度之和超过了 80%。与 Con 组相比,Et 组厚壁菌门丰度提高了 4.97%,而拟杆菌门的丰度降低了 4.30%。与 Et 组相比,EtCM 组厚壁菌门丰度降低了 30.96%,拟杆菌门丰度提高了 27.9%。EtNM 组厚壁菌门丰

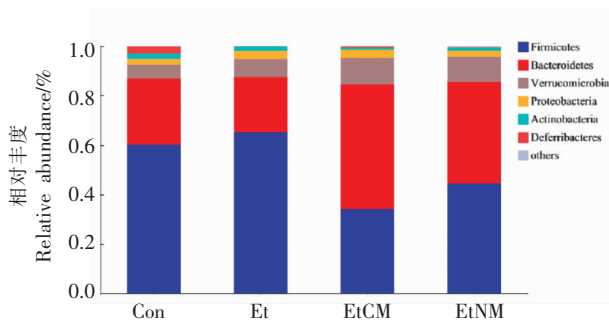


图7 小鼠肠道菌群门水平物种结构分析柱状图

Fig.7 Histogram of phylum level species composition analysis of intestinal flora in mice

度降低了 20.71%，拟杆菌门丰度提高了 18.70%。其中,EtCM 组有效提高了小鼠肠道菌群的丰度。2.5.2 基于属水平上的物种结构分析 由图 8 可知,在属水平上,瘤胃菌科(*Ruminococcaceae*)下的未知属 *Ruminococcaceae_UCG-013*、副拟杆菌属(*Parabacteroides*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、阿克曼菌属(*Akkermansia*)、Muribaculaceae 科下的未知属 *norank_f_Muribaculaceae* 属、柔嫩梭菌属(*Faecalibaculum*)、*Romboutsia* 属、毛螺旋菌科(*Lachnospiraceae*)下的未知属 *norank_f_Lachnospiraceae* 等在小鼠结肠肠道中相对丰度较高的菌属。其中瘤胃菌科下的未知属 *Ruminococcaceae_UCG-*

013、副拟杆菌属、拟杆菌属、阿克曼菌属的丰度最高。此外,由图 9 可知,瘤胃菌科下的未知属 *Ruminococcaceae_UCG-013* 是 Et 组丰度最高的优势菌属,相对丰度占 41%。副拟杆菌属、拟杆菌属和阿克曼菌属均为 EtCM 组和 EtNM 组的优势菌属。3 个菌属的丰度各占 10%以上,其中 EtCM 组的 3 个菌属丰度之和最高约为 45%。而 EtNM 组的 3 个菌属丰度之和最高约为 36%,这与门水平结果相一致。Blacher 等^[23]研究发现,瘤胃菌会加重肌萎缩性侧索硬化症。Ponziani 等^[24]还研究发现肝癌患者肠道菌群中瘤胃菌属丰度增加,双歧杆菌丰度减少。本实验中 Et 组小鼠结肠菌群的瘤胃菌科下的未知属 *Ruminococcaceae_UCG-013* 丰度显著提高,表明瘤胃菌科下的未知属 *Ruminococcaceae_UCG-013* 可能是加重慢性 ALD 的一类菌属。Wang 等^[25]研究发现白藜芦醇处理的小鼠微生物菌群结构发生了显著变化,拟杆菌、毛螺菌科下的未知属 *Lachnospiraceae_NK4A136_group*、*Lachnospiraceae*、布劳特氏菌(*Blautia*)、副拟杆菌属和 *Ruminiclostridium_9* 丰度显著提高,并且这些菌群能调节脂肪代谢,还通过减少炎症来改善肠屏障功能。Henning 等^[26]也得到了同等结果。最新研究发现,罗斯伯里氏菌属(*Roseburia*)、阿克曼菌属、丙酸杆菌属(*Propionibacterium*)等可以参与到

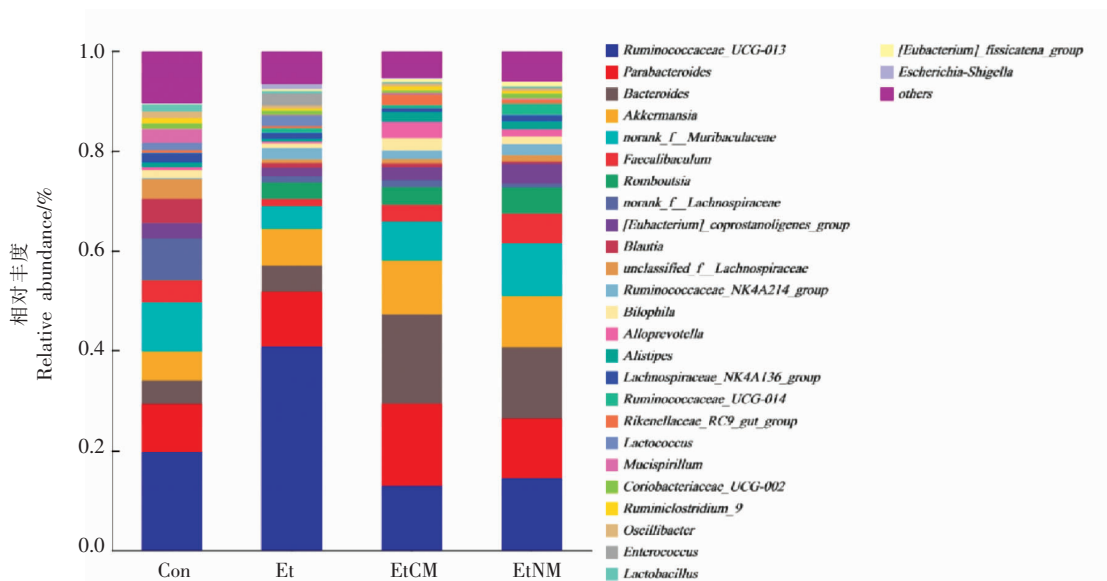


图8 小鼠肠道菌群属水平物种结构分析柱状图

Fig.8 Histogram of the analysis of the genus level species composition of the mouse intestinal flora

- biofunctional properties [J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 60: 1–13.
- [4] XU R H, XIU L, ZHANG Y L, et al. Probiotic and hepatoprotective activity of lactobacillus isolated from Mongolian camel milk products [J]. *Beneficial Microbes*, 2019, 10(6): 699–710.
- [5] SINGAL A K, BATALLER R, AHN J, et al. ACG clinical guideline: Alcoholic liver disease [J]. *American Journal of Gastroenterology*, 2018, 113(2): 175–194.
- [6] SEHRAWAT T S, LIU M, SHAH V H. The knowns and unknowns of treatment for alcoholic hepatitis [J]. *Lancet Gastroenterology and Hepatology*, 2020, 5(5): 494–506.
- [7] CHAN P, STARKEL P, TURNER J R, et al. Dysbiosis-induced intestinal inflammation activates TNFRI and mediates alcoholic liver disease in mice [J]. *Hepatology*, 2015, 61(3): 883–894.
- [8] YANG A M, INAMINE T, HOCHRATH K, et al. Intestinal fungi contribute to development of alcoholic liver disease [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2017, 127(7): 2829–2841.
- [9] BAJAJ J S. Alcohol, liver disease and the gut microbiota [J]. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 2019, 16(4): 235–246.
- [10] MING L, QIAO X Y, YI LI, et al. Camel milk modulates ethanol-induced changes in the gut microbiome and transcriptome in a mouse model of acute alcoholic liver disease [J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(5): 3937–3949.
- [11] BERTOLA A, MATHEWS S, KI S H, et al. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model) [J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(3): 627–637.
- [12] LIN H, CHEN D, DU Q, et al. Dietary copper plays an important role in maintaining intestinal barrier integrity during alcohol-induced liver disease through regulation of the intestinal HIF-1 alpha signaling pathway and oxidative stress [J]. *Frontiers in Physiology*, 2020, 11: 1–10.
- [13] VASSALLO G, MIRIJELLO A, FERRULLI A, et al. Review article; Alcohol and gut microbiota the possible role of gut microbiota modulation in the treatment of alcoholic liver disease [J]. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2015, 41(10): 917–927.
- [14] ZHANG W, ZHONG W, SUN Q, et al. Hepatic overproduction of 13-HODE due to ALOX15 upregulation contributes to alcohol-induced liver injury in mice [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 1–10.
- [15] YANG Y, MISRA B B, LIANG L, et al. Integrated microbiome and metabolome analysis reveals a novel interplay between commensal bacteria and metabolites in colorectal cancer [J]. *Theranostics*, 2019, 9(14): 4101–4114.
- [16] BULL O L, FENG W K I, WANG Y, et al. Metagenomic analyses of alcohol induced pathogenic alterations in the intestinal microbiome and the effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG treatment [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): 1–10.
- [17] QIAN X B, CHEN T, XU Y P, et al. A guide to human microbiome research: Study design, sample collection, and bioinformatics analysis [J]. *Chinese Medical Journal*, 2020, 133(15): 1844–1855.
- [18] WANG Y, XU L, GU Y Q, et al. MetaCoMET: A web platform for discovery and visualization of the core microbiome [J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(22): 3469–3470.
- [19] FENG J, ZHAO F, SUN J, et al. Alterations in the gut microbiota and metabolite profiles of thyroid carcinoma patients [J]. *International Journal of Cancer*, 2019, 144(11): 2728–2745.
- [20] MORRIN S T, LANE J A, MAROTTA M, et al. Bovine colostrum-driven modulation of intestinal epithelial cells for increased commensal colonization [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(6): 2745–2758.
- [21] MORRIN S T, MCCARTHY G, KENNEDY D, et al. Immunoglobulin G from bovine milk primes intestinal epithelial cells for increased colonization of bifidobacteria [J]. *AMB Express*, 2020, 10(1): 1–10.
- [22] ZHAO J, FAN H, KWOK L, et al. Analyses of physicochemical properties, bacterial microbiota, and lactic acid bacteria of fresh camel milk collected in Inner Mongolia [J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(1): 106–116.
- [23] BLACHER E, BASHIARDES S, SHAPIRO H, et al. Potential roles of gut microbiome and metabolites in modulating ALS in mice [J]. *Nature*, 2019, 572(7770): 474–480.
- [24] PONZIANI F R, BHOORI S, CASTELLI C, et al. Hepatocellular carcinoma is associated with gut mi-

- crobiota profile and inflammation in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Hepatology*, 2019, 69(1): 107–120.
- [25] WANG P, LI D, KE W, et al. Resveratrol-induced gut microbiota reduces obesity in high-fat diet-fed mice[J]. *International Journal of Obesity*, 2020, 44(1): 213–225.
- [26] HENNING S M, YANG J, HSU M, et al. Decaffeinated green and black tea polyphenols decrease weight gain and alter microbiome populations and function in diet-induced obese mice[J]. *European Journal of Nutrition*, 2018, 57(8): 2759–2769.
- [27] SANDERS M E, MERENSTEIN D J, REID G, et al. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: From biology to the clinic[J]. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 2019, 16(10): 605–616.
- [28] YI D, CRISTINA L, SONJA L, et al. Bacteriophage targeting of gut bacterium attenuates alcoholic liver disease[J]. *Nature*, 2019, 575: 505–509.
- [29] SZABO G. Gut-liver axis in alcoholic liver disease[J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(1): 30–36.
- [30] MUTLU E, KESHAVARZIAN A, ENGEN P, et al. Intestinal dysbiosis: A possible mechanism of alcohol-induced endotoxemia and alcoholic steatohepatitis in rats[J]. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 2009, 33(10): 1836–1846.
- [31] CHU J R, KANG S Y, KIM S E, et al. Prebiotic UG1601 mitigates constipation-related events in association with gut microbiota: A randomized placebo-controlled intervention study[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2019, 25(40): 6129–6144.
- [32] YANG C, DENG Q, XU J, et al. Sinapic acid and resveratrol alleviate oxidative stress with modulation of gut microbiota in high-fat diet-fed rats[J]. *Food Research International*, 2019, 116: 1202–1211.

Effect of Camel Milk on Intestinal Flora of Mice with Chronic Alcoholic Liver Injury

Bai Luping¹, Qiao Xiangyu¹, Hai Le¹, Qi Bule¹, Jirimutu^{1,2}, Ming Liang^{1,2*}

(¹Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Bioengineering, Ministry of Education, Inner Mongolia Agriculture University, Hohhot 010018

²Inner Mongolia Institute of Camel Research, Alxa 750306, Inner Mongolia)

Abstract Purpose: To explore the effect of camel milk on the diversity and structure of intestinal microflora in mice with chronic alcoholic liver injury. In this experiment, male C57BL/6NCR mice were randomly divided into 4 groups: control group (Con, $n=6$), model group (Et, $n=6$), camel milk dose group (EtCM, $n=6$) and cow milk dose group (EtNM, $n=6$); the experiment was conducted for 8 weeks, the first 4 weeks were fed with Lieber-DeCarli liquid feed (including control), and the following 4 weeks were fed with corresponding milk or saline on the basis of feeding Lieber-DeCarli liquid feed. After the gavage, the NIAAA model was established by gavage 31.5% alcohol solution at a dose of 5 g/kg. Serum LPS content was detected, and colonic feces of mice were collected under sterile conditions for 16S rRNA sequencing, and intestinal flora alpha diversity, beta diversity, and species structure based on genus and genus levels were analyzed. Serum index results showed that serum LPS of mice in EtCM group and EtNM group was significantly reduced ($P < 0.01$). 16S rRNA sequencing results showed that camel milk and cow milk significantly increased the abundance and uniformity of the colonic intestinal flora of ALD mice, and better adjusted the structure of intestinal flora; among them, camel milk showed better alpha diversity than cow milk. At the phylum level, camel milk and cow milk significantly increased the abundance of Bacteroides phylum and decreased the abundance of thick-walled phylum. At the genus level, camel milk and cow milk significantly increased the abundance of *Bacteroides*, *Bacteroides*, and *Ackermania*, and reduced the abundance of the unknown genus *Ruminococcaceae_UCC-013* under the Rumenaceae family. Among them, the beneficial bacteria abundance of camel milk is 9% higher than that of cow milk. Conclusion: Camel milk can adjust the intestinal flora structure by changing the intestinal flora environment of ALD mice. It shows that camel milk can be used as a functional dairy product to regulate intestinal flora, and can prevent intestinal barrier dysfunction caused by chronic ALD.

Keywords camel milk; 16S rRNA; chronic alcoholic liver injury; intestinal flora