

## 添加后生元 Probio-Eco<sup>®</sup>对奶粉抗炎特性、免疫和肠道菌群的影响

冯翠娇<sup>1,2,3</sup>, 张唯勤<sup>1,2,3</sup>, 彭传涛<sup>4</sup>, 张和平<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 呼和浩特 010018

<sup>2</sup> 农业农村部奶制品加工重点实验室 呼和浩特 010018

<sup>3</sup> 内蒙古乳品生物技术与工程重点实验室 呼和浩特 010018

<sup>4</sup> 青岛农业大学食品科学与工程学院 山东青岛 266109

**摘要** 目的:选择大鼠炎症性肠病(IBD)模型,探究添加后生元 Probio-Eco<sup>®</sup>奶粉的抗炎特性及对免疫和肠道菌群的调节作用。方法:选用 7 周龄 Wistar 雄性大鼠,自由饮用添加 3%(3 g/100 mL)葡聚糖硫酸钠(DSS)水溶液 7 d,诱导 IBD 模型。实验分为模型组、对照奶粉组及后生元奶粉组,分别灌胃等量生理盐水、对照奶粉及后生元奶粉 14 d。测定大鼠体重、血清细胞因子水平以及组织病理学变化,收集大鼠粪便,进行非靶向代谢组学及宏基因组学分析。结果:与模型组相比,后生元奶粉干预可显著提高大鼠体重( $P<0.01$ );组织病理学分析显示:模型组肠黏膜上皮细胞损伤严重,组织充血、水肿;两种奶粉干预后均有所改善。同时,相较于对照奶粉,摄入后生元奶粉会使 DSS 诱导的结肠组织损伤评分及 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  水平显著降低( $P<0.05$ )。宏基因组结果显示,摄入后生元奶粉可显著缩小大鼠个体间肠道菌群异质性,同时下调含氏小螺菌和肠拟杆菌的相对丰度,增加粪便拟杆菌、鼠乳杆菌、狄氏副拟杆菌和阴道乳杆菌的相对丰度。此外,后生元奶粉分别上调和下调粪便代谢物 113 个和 68 个,显著富集维生素 E 合成、胆汁酸合成、丁酸代谢、脂肪酸合成、TCA 循环及色氨酸代谢通路。结论:后生元奶粉通过调节大鼠肠道菌群,改变粪便代谢物,从而降低血清促炎细胞因子水平,最终缓解大鼠 IBD 症状。

**关键词** 后生元;奶粉;炎症性肠病;肠道菌群;抗炎特性

文章编号 1009-7848(2022)11-0123-10 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.11.014

炎症性肠病(Inflammatory bowel disease, IBD)是一种涉及回肠、直肠和结肠的慢性、非特异性免疫介导的胃肠道疾病<sup>[1]</sup>。随着经济的发展以及饮食的西方化,中国 IBD 发病率的增长速度已成为亚洲地区最快的国家<sup>[2]</sup>,呈逐年上升的趋势。虽然 IBD 病因尚未阐明,但是目前认为,肠道微生物群失衡和免疫系统功能障碍在 IBD 发病中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。IBD 患者的肠道菌群结构显著区别于健康对照,主要表现为微生物多样性下降,微生物群落稳定性改变<sup>[4]</sup>。

目前,IBD 的治疗以缓解和预防疾病复发为主。虽然仍无法了解肠道菌群失调与肠道炎症的因果关系<sup>[5]</sup>,但是以肠道菌群为导向的各种治疗方法,包括饮食、益生菌、粪菌移植、益生元等,通过恢复肠道共生菌的多样性和组成,成为 IBD 在内的胃肠道疾病的新型干预措施<sup>[6]</sup>。国际益生菌和益

生元科学协会(International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, ISAPP)于 2021 年对后生元的定义和范围发表共识声明,指出后生元是对宿主健康有益的无生命微生物和/或其成分的制剂<sup>[7]</sup>。作为新起之秀,后生元引领了新一轮的研究热潮。相较于益生菌,后生元具有保质期长以及化学结构明确等优点。重要的是后生元发挥益生功能无需依赖于活细胞,可避免活菌所引起的潜在风险<sup>[8]</sup>。本研究通过建立葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的 IBD 大鼠模型,探究含有后生元 Probio-Eco<sup>®</sup>的奶粉的抗炎特性,以及对肠道菌群和机体免疫的调节作用及可能机制,以期加深对后生元的认知,并为相关产品开发提供新的方向。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物

7 周龄 SPF 级 Wistar 雄性大鼠购自中国北京维通利华实验动物技术有限公司(SCXK(京)2019-0008),体重为 200~220 g。在实验期间,所有动物保持在 12 h/12 h 昼夜明暗交替的 SPF 级屏

收稿日期:2022-09-09

基金项目:内蒙古自治区科技重大专项(2021ZD0014)

第一作者:冯翠娇,女,博士生

通信作者:张和平 E-mail: hepingdd@vip.sina.com

障环境中【温度(22±2)℃,湿度(50±10)%】。动物自由采食和饮水。实验经内蒙古农业大学实验动物福利与伦理委员会批准。

## 1.2 材料、试剂与仪器

市售奶粉,中国内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司;大豆粉,上海麦克林生化科技股份有限公司;脱脂乳,新西兰恒天然集团;柠檬酸钠,苏州如日化工科技有限公司;甲醇,上海麦克林生化科技股份有限公司;葡聚糖硫酸钠(分子质量:36 000~50 000 u),美国MP生物医疗公司;ELISA试剂盒,美国R&D公司;QIAamp Fast DNA Stool Mini-Kit试剂盒,德国凯杰生物公司;0.22 μm微孔滤膜过滤器,中科瑞泰(北京)生物科技有限公司。

SRH60-70型高压均质机,上海申鹿均质机有限公司;7890B GC-5977A MSD型气相色谱-质谱联用仪,美国Agilent公司;-80℃超低温冰箱,青岛海尔集团;高速台式离心机,德国Eppendorf公司;分析天平,瑞士Mettler公司;5 mL注射器,美国BD公司;12号灌胃针,北京江晨源远生物科技有限责任公司;微量紫外分光光度计,赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

## 1.3 后生元 Probio-Eco®制备

将大豆粉、脱脂乳和柠檬酸钠与水充分混合15 min,并预热至55~60℃。在18~20 MPa下均质后于95℃杀菌60 min。冷却至35℃后分别接种3种益生菌菌株(干酪乳酪杆菌 Zhang、植物乳植杆菌 P-8、动物双歧杆菌乳亚种 V9),恒温(35℃)搅

拌发酵,pH值至4.50~4.60时终止发酵过程。然后加入麦芽糊精,并将发酵液在75℃灭菌15 min,随后进行无菌均质(25~30 MPa)。以进风温度210℃、出风温度88℃的条件对发酵液进行喷雾干燥后得到后生元 Probio-Eco®。经检测符合关于污染物、真菌毒素以及微生物限量标准。同时按照国家标准 GB 5009.157-2016《食品安全国家标准 食品有机酸的测定》<sup>[9]</sup>和 GB 5009.124-2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定》<sup>[10]</sup>分别检测后生元 Probio-Eco®中有机酸和氨基酸的含量。

将后生元 Probio-Eco®以1%添加量与市售奶粉混合均匀,即得到后生元奶粉。对照奶粉组不加后生元 Probio-Eco®。

## 1.4 IBD 模型构建

大鼠屏障环境适应性饲喂7 d后,连续饮用添加3%(3 g/100 mL)DSS的无菌水溶液7 d,完成IBD模型的构建。第8天开始饮用无菌水。

## 1.5 动物分组与样本收集

实验设计如图1所示,分为模型组、对照奶粉组、后生元奶粉组,每组8只。模型组大鼠每天灌胃2 mL生理盐水,对照奶粉组和后生元奶粉组每天灌胃等量体积相应奶粉(800 mg/2 mL),每天一次,连续14 d。每7 d记录一次大鼠体重,观察大鼠精神状态、粪便性状。第21天时,收集大鼠粪便,用于宏基因组学和代谢组学分析。大鼠经异氟烷麻醉后处死,收集血液用于细胞因子检测,取结肠组织用于病理学分析。

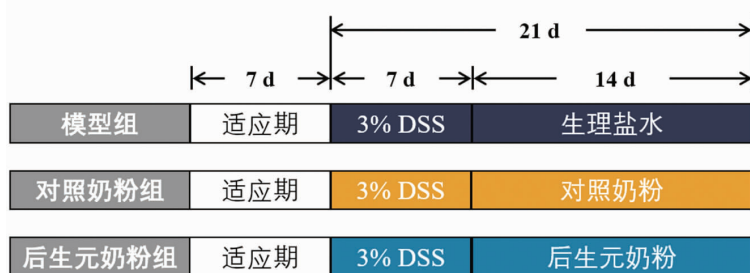


图1 实验设计

Fig.1 Experimental design

## 1.6 苏木素-伊红(H & E)染色

大鼠腹部消毒后,解剖并分离结肠组织。选取PBS冲洗后的结肠末端,将其固定于4%多聚甲醛

溶液中。固定后,取4 μm厚组织切片进行H & E染色,在不同倍数下详细观察组织切片情况,并记录切片中基本病理变化,如水肿、变性、坏死、增

生、纤维化、炎性变化等。组织病变程度采用五级分法,无病变或极少量病变计分为 0;有轻度病变或少量病变计分为 1;有中度病变或中等量病变计分为 2;有重度病变或多量病变计分为 3;有极重度病变或大量病变计分为 4。

### 1.7 酶联免疫吸附试验(ELISA)

大鼠血液于 3 000 r/min,离心 10 min 获得血清。使用 ELISA 试剂盒,按照制造商说明测定血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-10 含量。

### 1.8 粪便代谢组学测定

将贮藏于-80℃的粪便样本置于室温下自然解冻;称取 0.06 g 样品于含有 1 mL 预冷(冰浴)的甲醇-水溶液(体积比 4:1)的无菌离心管中,高速震荡 30 s 后超声 30 min。4℃下 4 000 $\times$ g 离心 10 min,吸取上清液于新的 2 mL 离心管中,吸取尽可能多的上清液再次重复以上甲醇提取步骤。将两次离心收集的上清液于 4℃下 10 000 $\times$ g 离心 5 min,得到的上清液通过 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤器以进行进一步分析。质控(QC)样品通过从每个上样瓶(1.5 mL)中吸取一定量样品混合至同一样品瓶中(约 1 mL)制备,用于评估 LC-MS 平台的重复性和稳定性。研究采用 UPLC-Q-TOF 系统,按照 Li 等<sup>[11]</sup>的研究进行系统参数设置。用 Progenesis QI 对下机数据进行峰值提取、峰值对齐、去卷积和归一化处理,进行多元数据分析并通过 KEGG 数据库对不同代谢产物注释以筛选差异代谢通路。

### 1.9 肠道菌群宏基因组测序及生物信息学分析

将第 21 天收集到的各组大鼠的新鲜粪便存放于灭菌的 2 mL EP 管中,存入-80℃冰箱备用。提取全部粪便样品的 DNA,并用微量紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳法测定提取的 DNA 浓度和纯度。全基因组测序在 Illumina-HiSeq 2500 PE150 测序平台上进行。每个样品产生约 5 Gb 下机数据。将下机得到的原始数据利用 HUMAnN2 软件进行质控及物种注释。

### 1.10 统计学分析

所有实验数据均以平均值 $\pm$ 标准差表示。采用 IBM SPSS 21.0 软件和 R 编程语言(v 4.1.1)进行统计分析。使用单因素方差分析以及 Tukey 多重比较检验三组数据之间的差异性。Wilcoxon 检验

用于两组数据之间的差异分析, $P<0.05$  认为差异有统计学意义。使用 R 软件包 (<http://www.R-project.org/>) 处理宏基因组数据。图形由 Origin 2017 和 R 软件包生成。

## 2 结果

### 2.1 后生元 Probio-Eco®中的有机酸和氨基酸含量

后生元 Probio-Eco®中检测到的有机酸和氨基酸含量如图 2 所示。共检测到 26 种有机酸,包含 12 种长不饱和脂肪酸和 14 种饱和脂肪酸,其中顺-9-十八碳一烯酸含量最高。共检测到 12 种氨基酸,包含 3 种成人必需氨基酸(苏氨酸、亮氨酸、赖氨酸)以及婴幼儿所需的组氨酸。此外,含有的精氨酸和胱氨酸为早产儿所必需。

### 2.2 含后生元的奶粉对大鼠体重的影响

整个实验期间,模型组、对照奶粉组和后生元奶粉组大鼠体重均呈现上升趋势。0~7 d,各组大鼠体重无明显差异。饮用 DSS 后大鼠出现粪便不成形,便血等情况。与模型组比较,在实验终点第 21 天时后生元奶粉可显著提高大鼠体重( $P<0.01$ ),且整体生长情况良好,腹泻等症状得到有效缓解。

### 2.3 含后生元的奶粉对大鼠结肠组织病理学的影响

大鼠结肠组织 H & E 染色结果如图 4 所示,DSS 诱导后模型组大鼠结肠组织结构模糊,水肿明显,大量炎性细胞浸润,可见上皮细胞脱落现象。两种奶粉干预后均有所改善,大鼠黏膜层肠上皮结构基本完整,上皮细胞脱落和固有层与黏膜下层的水肿较少。同时后生元奶粉能够明显减轻结肠水肿状况。组织学损伤评分显示出与切片一致的结果,后生元奶粉降低 DSS 诱导后结肠组织损伤效果优于对照奶粉( $P<0.05$ )。

### 2.4 含后生元的奶粉对大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-10 水平的影响

由图 5 可知,与对照奶粉组相比,后生元奶粉干预可有效降低 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  水平,尤其是 TNF- $\alpha$  水平( $P<0.05$ )。IL-6 和 IL-10 的水平在三组之间无显著差异。以上结果表明后生元奶粉可以通过降低血清中促炎细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-

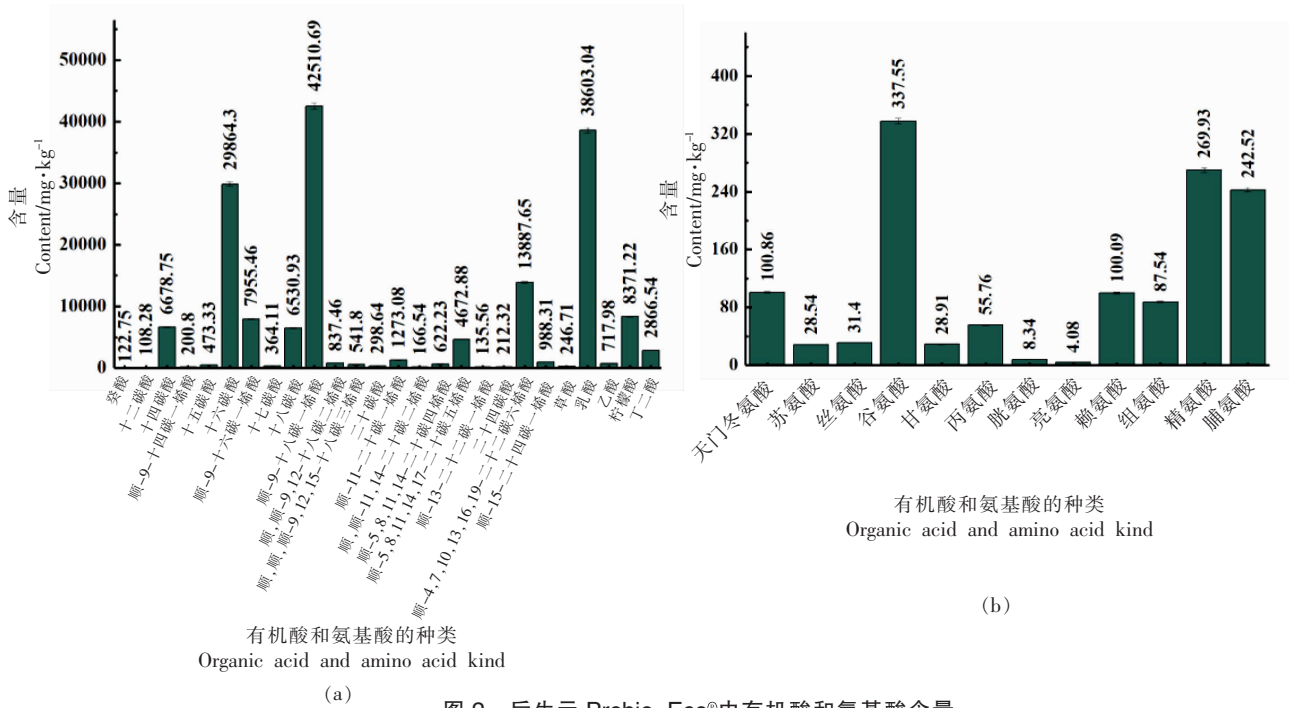
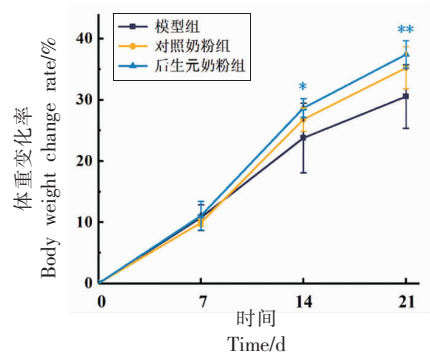
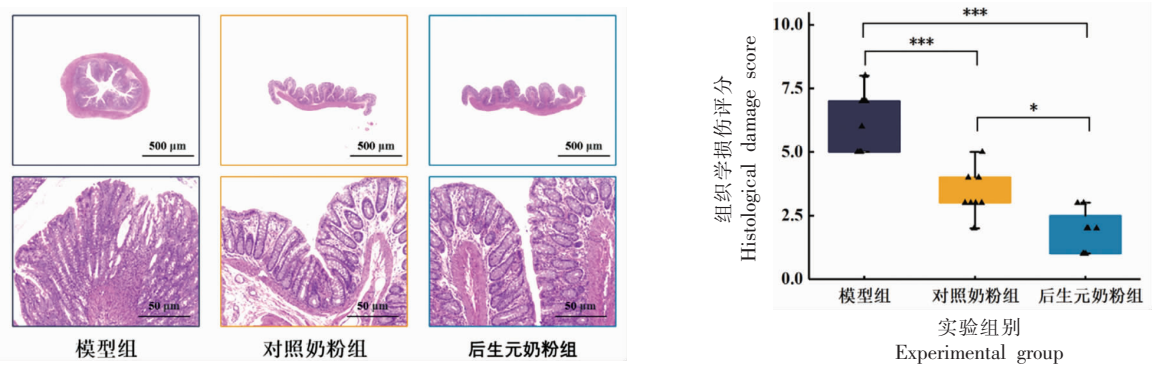


图2 后生元 Probio-Eco<sup>®</sup>中有机酸和氨基酸含量  
Fig.2 Organic acid and amino acid content in postbiotics Probio-Eco<sup>®</sup>



注: 体重变化率指与 0 d 时体重相比; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。  
图3 实验过程中大鼠体重的变化  
Fig.3 Body weight changes of rats during the experiment



注: \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ 。  
图4 大鼠结肠组织 H & E 染色及组织学损伤评分  
Fig.4 H & E staining and histological damage scores of rat colon tissue



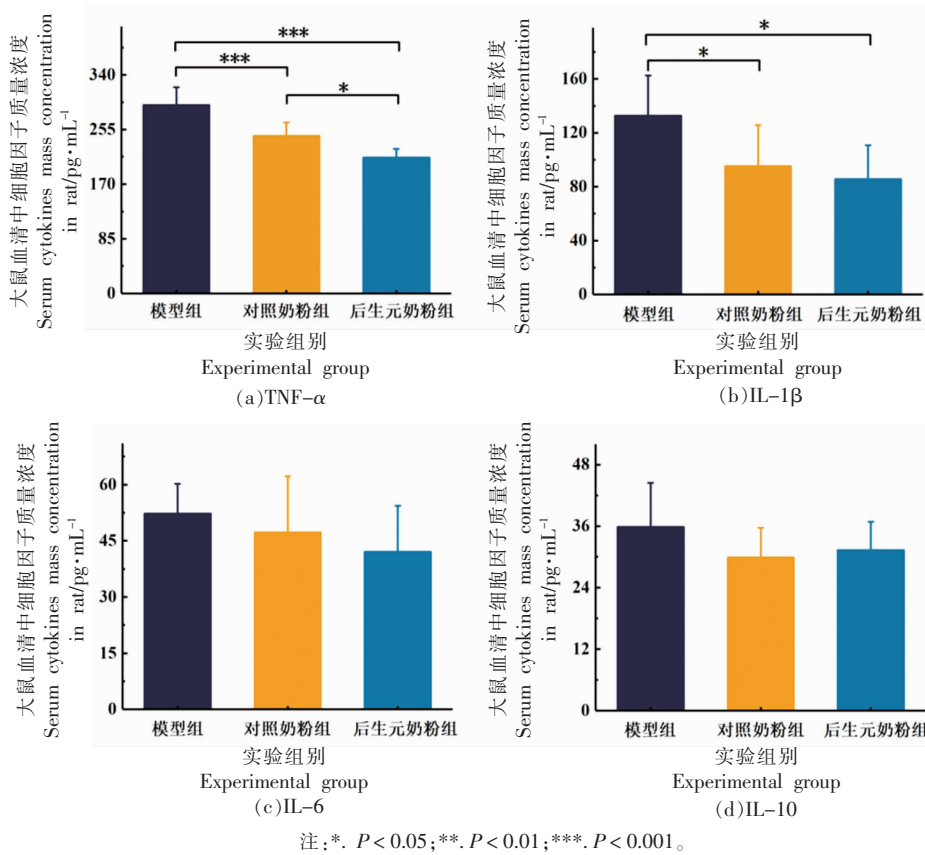


图 5 大鼠血清中细胞因子的变化

Fig.5 Serum cytokines changes in rat

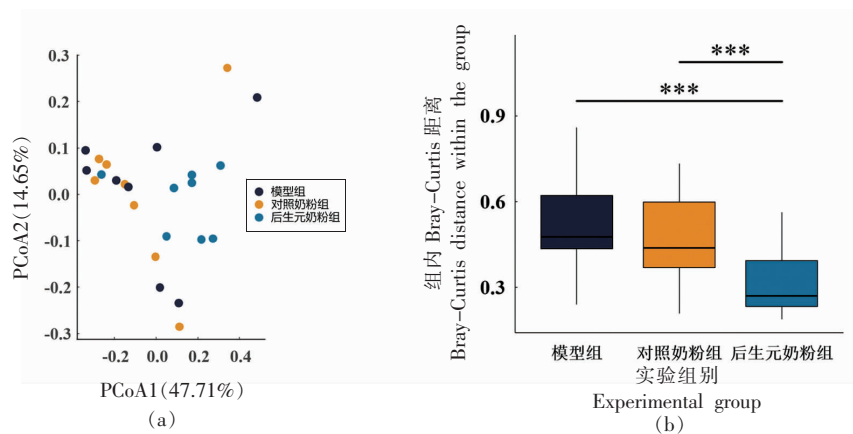
1β 的表达进而缓解 DSS 诱导的肠道炎症。

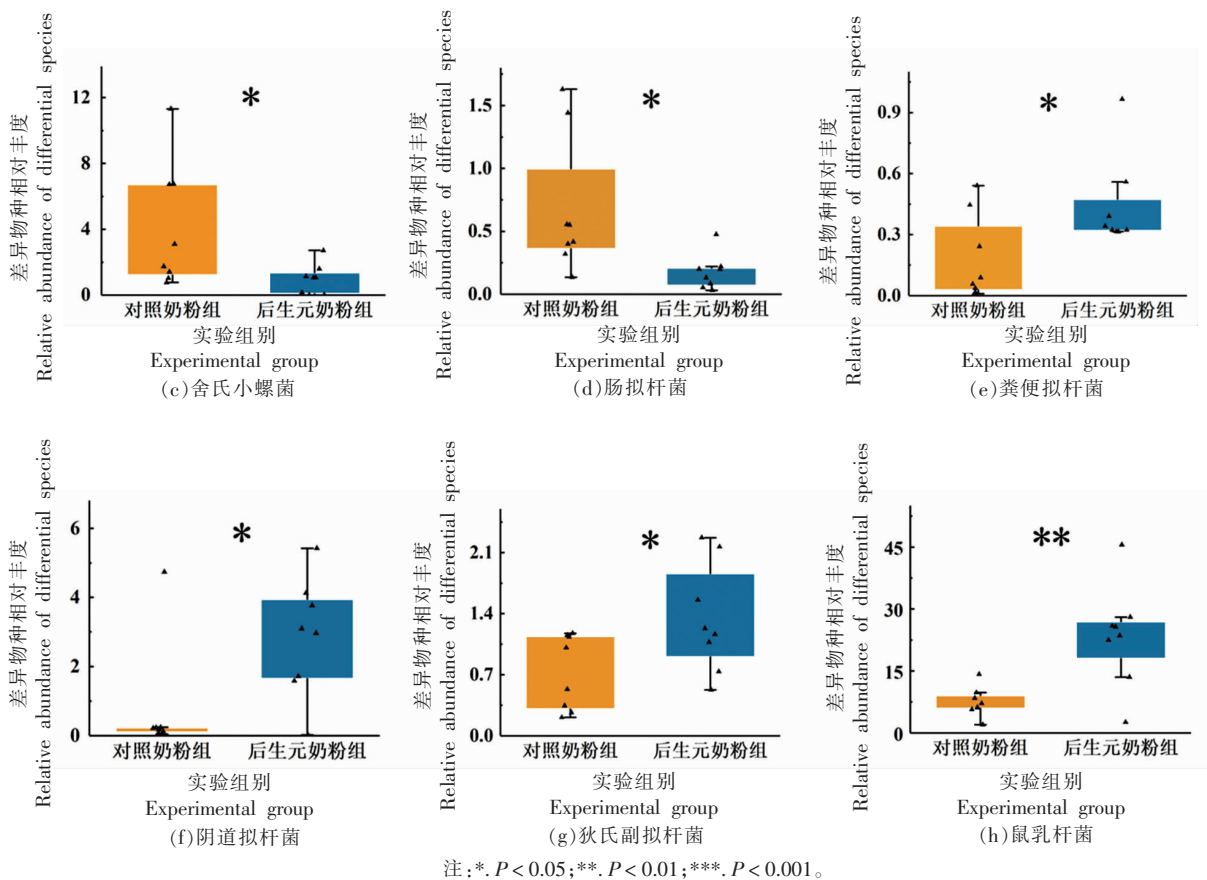
### 2.5 含后生元的奶粉对大鼠肠道菌群结构及组成的影响

炎症性肠病与肠道微生物群的改变密切相关。基于 Bray-Curtis 距离分析不同处理组大鼠的肠道菌群结构变化。PCoA 图反映出后生元奶粉组有远离其它组的趋势，可能代表了不同的菌群结构。此外，后生元奶粉组的组内 Bray-Curtis 距离显著低于模型组和对照奶粉组 ( $P < 0.001$ )，表明灌

胃后生元奶粉缩小了个体之间肠道微生物群的异质性，可有效恢复 DSS 诱导引起的肠道菌群结构失调。

进一步筛选对照奶粉组和后生元奶粉组之间的差异细菌，共注释到 6 个差异物种。其中，舍氏小螺菌和肠拟杆菌在后生元奶粉组中的相对丰度显著低于对照奶粉组，而粪便拟杆菌、鼠乳杆菌、狄氏副拟杆菌和阴道乳杆菌则在后生元奶粉组中高表达。





注:\*.  $P < 0.05$ ; \*\*.  $P < 0.01$ ; \*\*\*.  $P < 0.001$ 。

图6 大鼠肠道菌群的变化

Fig.6 Intestinal microbiota changes in rats

## 2.6 含后生元的奶粉对大鼠粪便代谢物的影响

使用 Metabo Analyst 在线工具分析各组大鼠的粪便代谢组特征。PCA 得分图指出,与模型组相比,对照奶粉组和后生元奶粉组呈现显著不同的聚类模式,表明 IBD 大鼠饮食奶粉后对其粪便代谢影响较大,可明显改变其代谢特征。此外,利用火山图共筛选出对照奶粉组和后生元奶粉组的差异代谢物 181 个( $VIP > 1$ ,  $|\text{fold-change}| < 2$ ,  $P < 0.05$ )。与对照奶粉相比,后生元奶粉上调代谢物 113 个,下调代谢物 68 个。进一步利用 KEGG 数据库进行后生元奶粉组的代谢通路富集分析。预测到的通路包括维生素 E 合成、胆汁酸合成、丁酸代谢、脂肪酸合成、TCA 循环以及色氨酸代谢,推测后生元奶粉可能通过调节上述代谢途径,从而达到缓解大鼠 IBD 的效果。

## 3 讨论

炎症性肠病临床症状主要表现为腹痛、腹泻、

便血等,且常反复发作,难以治愈,甚至会引起结肠癌、血栓等严重疾病。近年来该病在我国发病率不断升高,已成为一种社会公共性健康问题。作为一种饮食成分,后生元的摄入会影响机体肠道菌群的组成。本研究采用 3% DSS 诱导的大鼠 IBD 模型,以普通奶粉作为对照,用添加了后生元 Probio-Eco®的奶粉进行干预,发现后生元奶粉可通过调节肠道菌群及代谢物的产生,减轻机体炎症反应,有效缓解大鼠 IBD 症状。

经测定,后生元 Probio-Eco®中富含多种长链不饱和脂肪酸,其对于婴儿大脑和身体发育具有重要作用<sup>[12]</sup>。此外,检测到的众多氨基酸是构成人体免疫系统的基本原料,并影响其功能。补充全面均衡的氨基酸,将有助于提高机体免疫力。因此,后生元 Probio-Eco®可以作为一种生物活性成分,添加至奶粉中赋予其良好的营养特性。

本研究发现,DSS 组大鼠在整个生长过程中仍表现为体重增加,后生元奶粉干预后可显著增

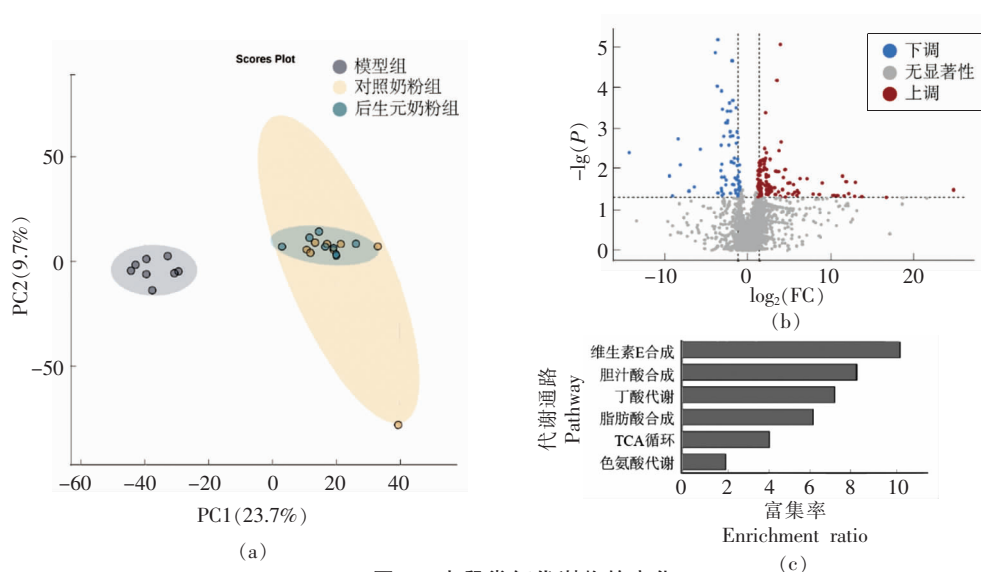


图 7 大鼠粪便代谢物的变化

Fig.7 Fecal metabolites changes in rats

加大鼠体重增长速度。追溯相关文献,发现在 IBD 啮齿动物模型中确实报告了对体重增加/减少的不同影响。例如,研究发现,小鼠在 DSS 诱导后基本上会表现为体重减轻。然而相比之下,大鼠在 DSS 诱导期间可能表现为体重下降亦或上升。例如,关于  $\beta$ -胡萝卜素和羊奶中分离的低聚糖减轻 DSS 诱导的 IBD 大鼠肠道炎症的研究中均发现 DSS 诱导后,大鼠体重减轻<sup>[13-14]</sup>。然而,在 JAK2 抑制剂 AG490 缓解 IBD 的研究中指出 DSS 诱导大鼠 IBD 期间,尽管大鼠体重在第 7 天体重增重减小,但是始终表现为增长趋势<sup>[15]</sup>。Mahoro 等<sup>[16]</sup>的研究也得到了类似的结果。Ritchie 等<sup>[17]</sup>利用新型高粱麸日粮改善 DSS 诱导的大鼠 IBD 时发现,无论是在 DSS 诱导前或后进行膳食干预,在整个过程中大鼠体重一直处于增长状态,这与本文的研究结果一致。体重变化在一定程度上反映了大鼠的健康状况<sup>[18]</sup>,虽然以上研究中体重对 DSS 诱导表现出不同的响应,但其共性均表明 DSS 处理会影响动物的正常生长。

炎症性肠炎与肠道菌群紊乱密切相关。正常情况下,肠道菌群处于一个动态平衡状态从而维持机体健康状况<sup>[19]</sup>。宏基因组研究揭示摄入 DSS 后会破坏肠道微生态的结构和功能<sup>[20]</sup>。益生菌广泛应用于肠道菌群的调节,并已在临床上用来改善某些肠道炎症损伤<sup>[21-23]</sup>。然而,益生菌干预并不总是对这些肠道疾病有效,甚至在疾病过程中存

在加重疾病的风险。后生元具有包括肠道、口腔以及皮肤等在内的众多作用靶点,其中肠道仍然是发挥健康作用的主要场所。研究发现热灭活的短乳杆菌 SBC8803 通过调节 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-12 的表达,改善氧化应激下肠上皮的屏障功能从而提高结肠炎小鼠的存活率<sup>[24]</sup>。唾液乳杆菌 Ls33 的裂解物作为一种有效的治疗策略,通过诱导抗炎细胞因子 IL-10 的产生而发挥保护结肠炎小鼠的作用<sup>[25]</sup>。此外,后生元能有效治疗克罗恩病引起的肠道菌群紊乱<sup>[26]</sup>。本研究确定了 6 种响应后生元奶粉干预的细菌。与对照奶粉组相比,灌胃后生元奶粉 14 d 后显著降低了舍氏小螺菌和肠拟杆菌的平均相对丰度。舍氏小螺菌已被证实与肠道炎症呈正相关关系,相较于缓解期,在小鼠结肠炎活跃期粪便中丰度较高,而特异性移植肠拟杆菌则会导致肠道内 IL-1 $\beta$  水平显著升高,肠道损伤加重<sup>[27]</sup>。反之,粪便拟杆菌和狄氏副拟杆菌的丰度显著增加。粪便拟杆菌作为一种短链脂肪酸产生菌能够有效缓解肠道炎症<sup>[28]</sup>。Treg 细胞主要参与调控机体炎症反应。狄氏副拟杆菌可刺激人 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞及小鼠的 IL-10<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Treg 产生抑炎因子 IL-10 从而降低炎症水平<sup>[29]</sup>。同时显著富集了两种重要的乳酸菌鼠乳杆菌和阴道乳杆菌,对于改善大鼠 IBD 症状具有重要作用。综上,后生元奶粉可能通过增加大鼠肠道有益微生物群的丰度,同时抑制一些有害微生物的生长因

而缓解大鼠 IBD。

后生元奶粉组的粪便代谢物表现出显著变化。以上显著富集的代谢途径对于肠道稳态均具有重要意义。研究证实 IBD 患者肠道中存在高丰度的变形杆菌<sup>[30]</sup>,而维生素 E 对变形杆菌有显著的抑制作用<sup>[31]</sup>。此外,丁酸和胆汁酸是重要的肠道菌群代谢物,具有抗炎作用,可调节肠道微生态平衡并恢复肠道功能<sup>[32-33]</sup>。脂肪酸生物合成和 TCA 循环均是肠道菌群的基础代谢,在细菌功能中占据重要位置。色氨酸作为人体的必需氨基酸,其代谢水平降低与 IBD 肠上皮屏障受损密切相关<sup>[20]</sup>。因而以上功能通路的调节可能是后生元奶粉改善 IBD 的另一种机制。

#### 4 结论

本研究选择 DSS 诱导的 IBD 动物模型,探究后生元奶粉对大鼠肠道菌群和机体免疫的调节作用及其可能机制。

1) 与模型组相比,后生元奶粉干预可显著提高大鼠体重;降低组织学损伤评分,以及促炎细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  水平。

2) 宏基因组测序结果表明,后生元奶粉降低大鼠肠道中舍氏小螺菌和肠拟杆菌的相对丰度,而增加粪便拟杆菌、鼠乳杆菌、狄氏副拟杆菌以及阴道乳杆菌的相对丰度。

3) 基于非靶向代谢组学分析发现,后生元奶粉改变了大鼠粪便代谢特征。显著上调 113 个代谢物,下调 68 个代谢物。同时后生元奶粉组共预测到 6 条显著富集的代谢通路,包括维生素 E 合成、胆汁酸合成、丁酸代谢、脂肪酸合成、TCA 循环以及色氨酸代谢。

综上所述,后生元奶粉可能通过降低血清促炎细胞因子水平,调节大鼠肠道菌群以及粪便代谢物,从而缓解大鼠 IBD 肠道炎症。本研究为后生元的开发利用以及奶粉制品的品质提升提供了科学依据,并为 IBD 的防治提供新的思路。

#### 参 考 文 献

[1] EISENSTEIN M. Biology: A slow-motion epidemic [J]. *Nature*, 2016, 540(7634): S98-S99.

- [2] VICTORIA C R, SASSAK L Y, NUNES H R D C. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo State, Brazil [J]. *Arquivos de Gastroenterologia*, 2009, 46 (1): 20-25.
- [3] LIU M L, DING J H, ZHANG H M, et al. *Lactobacillus casei* LH23 modulates the immune response and ameliorates DSS-induced colitis via suppressing JNK/p-38 signal pathways and enhancing histone H3K9 acetylation [J]. *Food & Function*, 2020, 11 (6): 5473-5485.
- [4] ARUMUGAM M, RAES J, PELLETIER E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome [J]. *Nature*, 2011, 473(7346): 174-180.
- [5] GEVERS D, KUGATHASAN S, DENSON L A, et al. The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease [J]. *Cell Host & Microbe*, 2014, 15 (3): 382-392.
- [6] WANG Z K, YANG Y S, SUN G, et al. The intestinal microbiota and inflammatory bowel disease [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2013, 25 (11): 1360-1363.
- [7] SALMINEN S, COLLADO M C, ENDO A, et al. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics [J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2021, 18(9): 649-667.
- [8] MAYORGAS A, DOTTI I, SALAS A. Microbial metabolites, postbiotics, and intestinal epithelial function [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2021, 65(5): 2000188.
- [9] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中有机酸的测定: GB5009.157-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 12. National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National food safety standard: Determination of organic acid in foods: GB 5009.157-2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016: 12.
- [10] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定: GB 5009.124-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 12. National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Food and



- Drug Administration. National food safety standard: Determination of amino acids in foods; GB 5009.124-2016 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2016, 12.
- [11] LI B H, FAN H, ZHANG Y, et al. Untargeted fecal metabolomics revealed biochemical mechanisms of the blood lipid-lowering effect of koumiss treatment in patients with hyperlipidemia[J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 78: 104355.
- [12] TURNER J. Your brain on food: A nutrient-rich diet can protect cognitive health [J]. *Generations*, 2011, 35(2): 99-106.
- [13] ZHU L Y, SONG Y, LIU H L, et al. Gut microbiota regulation and anti-inflammatory effect of  $\beta$ -carotene in dextran sulfate sodium-stimulated ulcerative colitis in rats [J]. *Journal of Food Science*, 2021, 86(5): 2118-2130.
- [14] LARA-VILLOSLADA F, DEBRAS E, NIETO A, et al. Oligosaccharides isolated from goat milk reduce intestinal inflammation in a rat model of dextran sodium sulfate-induced colitis[J]. *Clinical Nutrition*, 2006, 25(3): 477-488.
- [15] GUO J, WANG L Y, WU J, et al. The JAK2 inhibitor AG490 regulates the Treg/Th17 balance and alleviates DSS induced intestinal damage in IBD rats [J]. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2020, 47(8): 1374-1381.
- [16] MAHORO P, MOON H J, YANG H J, et al. Protective effect of gochujang on inflammation in a DSS-induced colitis rat model[J]. *Foods*, 2021, 10(5): 1072.
- [17] RITCHIE L E, TADDEO S S, WEEKS B R, et al. Impact of novel sorghum bran diets on DSS-induced colitis[J]. *Nutrients*, 2017, 9(4): 330.
- [18] FENG C, ZHANG W Q, ZHANG T, et al. Oral administration of pasteurized probiotic fermented milk alleviates dextran sulfate sodium-induced inflammatory bowel disease in rats[J]. *Journal of Functional Foods*, 2022, 94: 105140.
- [19] 郑慧怡, 马芙蓉, 罗晓清, 等. 牛初乳通过调节肠道菌群对小鼠溃疡性结肠炎的改善作用[J]. *中南医学科学杂志*, 2020, 48(5): 5.
- ZHENG H Y, MA F R, LUO X Q, et al. Bovine colostrum alleviating ulcerative colitis in mice by regulating intestinal flora[J]. *Medical Science Journal of Central South China*, 2020, 48(5): 5.
- [20] LIU S, ZHAO W J, LAN P, et al. The microbiome in inflammatory bowel diseases: From pathogenesis to therapy[J]. *Protein & Cell*, 2021, 12(5): 331-345.
- [21] GAO G Q, MA T, ZHANG T, et al. Adjunctive probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Probio-M9 administration enhances the effect of anti-PD-1 antitumor therapy via restoring antibiotic-disrupted gut microbiota[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 772532.
- [22] ZHANG X, TONG Y J, LÜ X M, et al. Prevention and alleviation of dextran sulfate sodium salt-induced inflammatory bowel disease in mice with bacillus subtilis-fermented milk via inhibition of the inflammatory responses and regulation of the intestinal flora [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 11: 622354.
- [23] FAN L, QI Y, QU S, et al. *B. adolescentis* ameliorates chronic colitis by regulating Treg/Th2 response and gut microbiota remodeling [J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1826746.
- [24] UENO N, FUJIYA M, SEGAWA S, et al. Heat-killed body of *Lactobacillus brevis* SBC8803 ameliorates intestinal injury in a murine model of colitis by enhancing the intestinal barrier function [J]. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2011, 17(11): 2235-2250.
- [25] FERNANDEZ E M, VALENTI V, ROCKEL C, et al. Anti-inflammatory capacity of selected *Lactobacilli* in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide [J]. *Gut*, 2011, 60(8): 1050-1059.
- [26] SOKOL H, PIGNEUR B, WATTERLOT L, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(43): 16731-16736.
- [27] WARGO J, ANDREWS M, DUONG C, et al. Gut microbiota signatures are associated with toxicity to combined CTLA-4 and PD-1 blockade [J]. *Nature Medicine*, 2021, 27(8): 1432-1441.
- [28] ZUO T, LIU Q, ZHANG F, et al. Depicting SARS-CoV-2 faecal viral activity in association with gut microbiota composition in patients with COVID-

- 19[J]. *Gut*, 2021, 70(2): 276–284.
- [29] CEKANAVICIUTE E, YOO B B, RUNIA T F, et al. Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(40): 10713–10718.
- [30] CARUSO R, LO B C, NÚÑEZ G. Host–microbiota interactions in inflammatory bowel disease[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2020, 20(7): 411–426.
- [31] STEINERT R E, LEE Y K, SYBESMA W. Vitamins for the gut microbiome[J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2020, 26(2): 137–140.
- [32] CHEN R, XU Y, WU P, et al. Transplantation of fecal microbiota rich in short chain fatty acids and butyric acid treat cerebral ischemic stroke by regulating gut microbiota[J]. *Pharmacological Research*, 2019, 148: 104403.
- [33] BROMKE M A, KRZYSZEK–KORPACKA M. Bile acid signaling in inflammatory bowel disease[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(16): 9096.

### Effect of Postbiotics Probio–Eco<sup>®</sup> on Anti–inflammatory Properties, Immunity and Gut Microbiota of Milk Powder

Feng Cuijiao<sup>1,2,3</sup>, Zhang Weiqin<sup>1,2,3</sup>, Peng Chuantao<sup>4</sup>, Zhang Heping<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Hohhot 010018

<sup>2</sup>Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Hohhot 010018

<sup>3</sup>Inner Mongolia Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Hohhot 010018

<sup>4</sup>College of Food Science and Engineering of Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong)

**Abstract** Objective: Selected the model of inflammatory bowel disease (IBD) to explore the anti–inflammatory property and regulatory effect on immunity and gut microbiota of milk powder added postbiotics Probio–Eco<sup>®</sup>. Methods: Seven–week Wistar male rats were used to induce IBD model by drinking 3% (3 g/100 mL) dextran sodium sulfate (DSS) solution for 7 days. The experiment included the model group, control milk powder group and postbiotics milk powder group. The rats were gavaged with the same amount of normal saline, control milk powder and postbiotics milk powder for 14 days. The body weight, serum cytokines and histopathological changes of the rats were monitored, and the feces of the rats were collected for untargeted metabolomics and metagenomics analysis. Results: Compared with the model group, the rat weight was significantly increased ( $P<0.01$ ). Histopathological analysis showed that the intestinal mucosal epithelial cells in the model group were severely damaged, and the tissue congestion and edema were obvious. Both kinds of milk powder improved after intervention. At the same time, compared with the control milk powder, the intake of postbiotics milk powder could significantly reduce the colon tissue damage score, TNF– $\alpha$  and IL–1 $\beta$  level after DSS induction ( $P<0.05$ ). The metagenomic results showed that the intake of postbiotics milk powder significantly reduced the gut microbiota heterogeneity among rats, and decreased the relative abundance of *Mucispirillum schaedleri* and *Bacteroides intestinalis*, and increased *Bacteroides stercoris*, *Lactobacillus murinus*, *Parabacteroides distasonis* and *Lactobacillus vaginalis*. In addition, postbiotics milk powder significantly up– and down regulated 113 and 68 fecal metabolites, respectively. Vitamin E biosynthesis, bile acid biosynthesis, butanoate metabolism, fatty acid biosynthesis, TCA cycle and tryptophan metabolism pathways were enriched. Conclusion: postbiotics milk powder reduced the serum proinflammatory cytokines level by regulating gut microbiota and changing fecal metabolites, and finally alleviated the symptoms of IBD in rats.

**Keywords** postbiotics; milk powder; inflammatory bowel disease; gut microbiota; anti–inflammatory property