

产细菌素 Enterocin Y3 粪肠球菌对小鼠肠道菌群及代谢功能的影响

杨珍珠^{1,2}, 陶乐仁², 赵陆恺^{1,2}, 王元¹, 迟海^{1,2*}

¹ 中国水产科学研究院东海水产研究所 上海 200090

² 上海理工大学健康科学与工程学院 上海 200093

摘要 为探讨产细菌素 Enterocin Y3 粪肠球菌 DH9003 的益生菌作用,对 15 只健康 C57 雄性小鼠进行等体积灌胃无菌生理盐水(对照组, $n=7$)和粪肠球菌 DH9003(处理组, $n=8$),4 周后收集小鼠粪便,测定粪肠球菌 DH9003 对小鼠肠道菌群结构和代谢功能的影响。结果显示,用粪肠球菌 DH9003 灌胃小鼠,7 d 内就可在其体内大量定植;7~28 d 时,该细菌数量缓慢增加并趋近稳定。通过观察小鼠肠道和肝脏组织切片研究病理学特征,灌胃粪肠球菌 DH9003 不会对小鼠肠道和肝脏产生有害影响,相反会使小鼠的肠黏膜更为密集且长度增加,改善小鼠肠黏膜。用粪肠球菌 DH9003 灌胃使该菌株成为不同分组小鼠肠道差异的主要物种。同时,补充粪肠球菌 DH9003 对小鼠肠道的菌群结构具有一定的调节作用,导致门水平上的变化为拟杆菌门和厚壁菌门相对丰度的差异变化。灌胃粪肠球菌 DH9003 前和灌胃 28 d 后,从小鼠粪便中共检出 254 种差异代谢物,其中 124 种显著上调,130 种显著下调。基于 KEGG 通路富集分析发现显著性水平较高的代谢通路有 ABC 转运蛋白和蛋白消化吸收通路。结论:小鼠摄入粪肠球菌 DH9003 后可在其体内定植并对肠道菌群和代谢能力有一定影响。

关键词 粪肠球菌; 粪肠球菌素 Y3; 肠道菌群; 代谢组学; 组织切片

文章编号 1009-7848(2024)02-0099-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.02.009

近年来,食源性致病菌的污染和繁殖一直是造成食品安全隐患的首要问题之一^[1]。特别是抗生素的滥用使细菌的耐药性增强,耐药性致病菌的残存和增殖成为全球公共卫生主要影响问题之一^[1]。此外,对于一些特定致病菌的治疗,传统的广谱抗生素会扰乱宿主肠道微生物群,影响其免疫、代谢等正常功能的发挥。因此,寻找更加安全、高效的抗菌药物十分迫切。

粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)为乳酸菌目肠球菌科肠球菌属的一种兼性厌氧菌,是一种广泛存在于人类或动物肠道的共生菌,具有较强的耐酸性和定植能力,营养要求不高,易培养的特点,可作为益生菌,在调节肠道微环境、机体免疫中发挥着重要作用^[2-3]。此外,粪肠球菌具有产核糖体合成抗菌肽(称为细菌素)的能力,粪肠球菌素具有安全性高、热稳定性强、易被蛋白酶水解和对

亲缘细菌有高效抑制的特点,对食源性致病菌、耐药性肠球菌和特定腐败菌的残存具有特异性消杀/抑制作用^[4]。粪肠球菌素这种靶向抑菌的作用,可避免对肠道其它有益微生物菌群造成伤害^[5]。有效开发和利用产细菌素的粪肠球菌对肠道疾病的调控具有重大意义^[6]。

实验室工作人员前期从羊奶中分离出 1 株在体外具有潜在益生特性的粪肠球菌 DH9003,结果发现其抑菌产物细菌素对食源性致病菌【如单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等】及其亲缘较近的耐药性肠球菌有高效益抑制作用^[7]。为进一步探讨该粪肠球菌的益生菌特性,本研究通过建立健康小鼠(C57 小鼠)模型,对小鼠灌胃粪肠球菌 DH9003,在不同时间内收集小鼠粪便,分析粪肠球菌 DH9003 在小鼠体内的定植情况。通过 16S rDNA 高通量测序及非靶向代谢组分析,研究粪肠球菌 DH9003 对小鼠肠道菌群结构及其代谢能力的影响。结合小鼠肝脏、肠道切片的显微镜观察,综合评估粪肠球菌 DH9003 的益生特性,为益生菌的资源开发提供技术支持,也为由食源性致病菌及耐药性肠球菌引起的肠道疾病的治疗提供新的解决思路。

收稿日期: 2023-02-15

基金项目: 上海市自然科学基金项目(22ZR1478500);
中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2016M02)

第一作者: 杨珍珠,女,硕士生

通信作者: 迟海 E-mail: chih@ecsf.ac.cn

1 材料与方法

1.1 实验动物与菌株

4周龄雄性小鼠 C57, 体质量(15±1) g, 购自上海市计划生育科学研究所实验动物经营部。产 Enterocin Y3 粪肠球菌 DH9003 (*E. faecalis* DH9003)、指示菌单增李斯特菌 LFM2813 (*Lis. monocytogenes* LFM2813), 保存于中国水产科学研究院东海水产研究所。

1.2 培养基与试剂耗材

鼠用配合饲料, 上海新辉动物饲料有限公司; 灌胃针(8号, 45 mm), 中科恒天科技有限公司; 氯化钠、甲醛、无水乙醇、二甲苯、中性树胶, 国药集团化学试剂有限公司; 磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH 7.2); 脑心浸液培养基 (Brain heart infusion, BHI), 美国 BD 公司; HE 染色套装, Servicebio 公司。

1.3 仪器与设备

立式灭菌锅 YXQ-LS-50SH, 上海博讯实业有限公司医疗器械厂; 恒温培养箱 HH.B11.500-BS-II, 上海跃进医疗器械机械厂; 高速离心机 TG16WS, 长沙湘智离心机仪器有限公司; Lecia 倒置光学显微镜、包埋机 JB-P、冻台 JB-L5, 武汉俊杰电子有限公司; 病理切片机 RM2016, 上海徠卡仪器有限公司; 脱水机 Donatello、染色机 Giotto, DIAPATH 公司; 组织摊片机 KD-P, 浙江省金华市科迪仪器设备有限公司; 烤箱 GFL-230, 天津市莱玻璃仪器设备有限公司; 载玻片 G6004, Servicebio 公司。

1.4 试验方法

1.4.1 菌株培养 将 2% 接种量的粪肠球菌 DH9003 接种于 BHI 液体培养基中, 30℃ 有氧条件下培养 14 h 后 4℃ 离心 2 min, 收集菌体, 用无菌生理盐水洗涤 2~3 次, 将菌体重悬到无菌生理盐水中, 采用平板计数法^[8]调整其浓度为 10⁹ CFU/mL, 即灌胃液, 4℃ 保存备用。

1.4.2 小鼠的饲养及灌胃 取雄性 C57 小鼠 15 只, 在动物房【温度(23±2)℃, 相对湿度 50%~60%, 12 h 明暗交替照明】中适应性喂养 7 d, 期间进食和饮水自由。

适应性喂养 1 周后, 将小鼠随机分成空白对照组(HD 组, n=7)和粪肠球菌处理组(YD 组, n=

8), 其中粪肠球菌处理组每天按 0.2 mL/10 g 体质量灌胃, 空白对照组每天灌胃相应剂量的无菌生理盐水, 每天 1 次。实验共干预 4 周, 定期收集小鼠粪便并移至-80℃ 冻存, 避免反复冻融。

1.4.3 小鼠粪便中细菌抑菌活性的测定及菌种鉴定 无菌条件下, 分别取 0, 7, 28 d 的小鼠粪便 0.1 g 至灭菌的离心管中, 加入 0.9 mL 无菌生理盐水溶解, 梯度稀释至 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸。分别将每个梯度样品涂布于 BHI 固体培养基中, 30℃ 过夜培养后, 以单增李斯特菌(*Lis. monocytogenes* LFM2813)为指示菌, 将指示菌以 2% 的接种量接种于 5 mL BHI 软琼脂中, 充分混匀, 均匀倾倒入于 BHI 固体培养基中, 待其凝固后, 30℃ 条件下过夜培养, 观察结果。

随机挑取每个梯度中有抑菌活性的单菌落, 接种于 BHI 液体培养基中, 30℃ 过夜培养。参考杨珍珠等^[9]的方法对有抑菌活性的细菌进行 DNA 提取、PCR 扩增及菌种鉴定。

1.4.4 组织切片分析 饲养实验结束后, 对小鼠进行颈椎脱臼处死(所有小鼠处死前一晚禁食 12 h)。解剖后获取小鼠的肝脏和肠道, 剪取适宜大小的新鲜肝脏和小肠组织, 用无菌生理盐水清洗后置入于甲醛固定液(V_{甲醛}:V_{PBS}=1:9)中固定, 参考 Sadeghipour 等^[9]的方法进行修剪、脱水、包埋、切片, 采用苏木精-伊红(Hematoxylin-eosin staining, HE)染色并封片, 于光学显微镜下观察肝脏和肠道组织结构。

1.4.5 小鼠粪便肠道菌群的测定 分别收集实验开始的第 0, 7 天和 28 天的空白对照和粪肠球菌 DH9003 处理组的小鼠粪便, 将其贮存于-80℃ 冰箱, 在干冰保存条件下送至上海派森诺生物科技有限公司进行 16S rDNA 基因组高通量测序。具体方法: 采用 DNA 提取试剂盒提取样本基因组 DNA, 使用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 纯度和浓度。待样本 DNA 质量满足建库测序要求后, 取适量样品用超纯水稀释至 20 ng/μL 进行扩增。以提取的细菌基因组 DNA 为模板, 使用高保真 DNA 聚合酶和带标签序列的特殊引物 F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3' 和 R: 5'-GGAC TACHVGGGTWTCTAAT-3' 对细菌 DNA 的 16S V3-V4 区域进行 PCR 扩增。采用 2% 的琼脂糖凝

胶电泳检测扩增产物的准确性,回收并纯化 PCR 扩增产物。采用 Quant-iT PicoGreen dsDNA 检测试剂盒定量分析,构建 Miseq 文库。采用 Illumina NovaseqPE250 平台测序。

1.4.6 生物信息学分析 根据序列质量对高通量测序的原始下机数据进行初筛,对问题样本进行重测和补测。通过质量初筛的原始序列按照标签序列信息进行文库和样本划分,并去除标签序列。按照 Caporaso 等^[10]的方法用 QIIME2 dada2 平台分析数据。

1.4.7 小鼠代谢能力的测定 小鼠代谢能力采用 Kinross 等^[11]的方法测定。实验结果中差异性代谢物分析采用具有监督的正交偏最小二乘判别分析(Orthogonal partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA)模型从数据集中筛选出与分组相关的差异脂类物质,以变量权重值(Variable importance for the projection, VIP)>1 和 $P < 0.05$ 为差异代谢物筛选标准,采用 KEGG 数据库对代谢通路进行注释,获得差异代谢物参与的代谢通路。

1.4.8 数据处理 利用 SPSS 25 软件进行单因素方差分析并通过 Duncan 法进行差异显著性分析($P < 0.05$ 表示差异显著)。每个处理组进行 6 次生物学重复,结果用平均值 \pm 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 小鼠粪便的抑菌活性及菌株鉴定结果

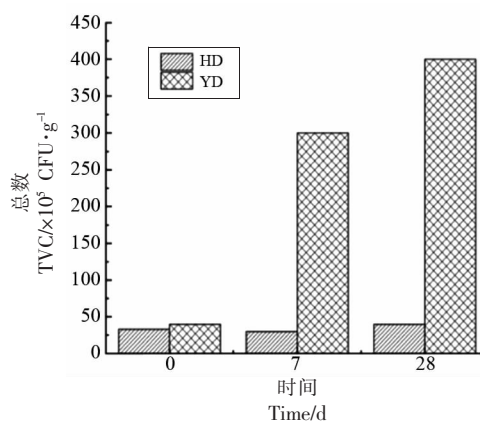
采用平板计数法统计各组小鼠粪便中对单增李斯特菌有抑菌活性的细菌菌落总数。由图 1 可见,空白对照(HD)组小鼠在灌胃 0,7 d 和 28 d 时的粪便中有抑菌活性的菌落总数保持稳定,菌落总数范围 $3.0 \times 10^6 \sim 5.0 \times 10^6$ CFU/g,而粪肠球菌 DH9003 处理(YD)组的小鼠粪便中有抑菌活性的细菌菌落总数在 0~7 d 大幅增长,在 7~28 d 增长缓慢并趋近稳定,表明小鼠在灌胃粪肠球菌 DH9003 后,该细菌在小鼠肠道中大量定植,然后随着灌胃时间的延长,肠道中 DH9003 的数量缓慢增加并逐渐趋于稳定。

从不同梯度涂布的平板中随机挑取 10 株细菌,发现它们对单增李斯特菌均有抑菌活性。对照组小鼠粪便中未发现抑制单增李斯特菌的菌

株。经鉴定所有细菌均为粪肠球菌。这间接说明粪肠球菌 DH9003 已大量定植在小鼠肠道,且属于优势菌株。

2.2 小鼠肝脏、肠道切片观察结果

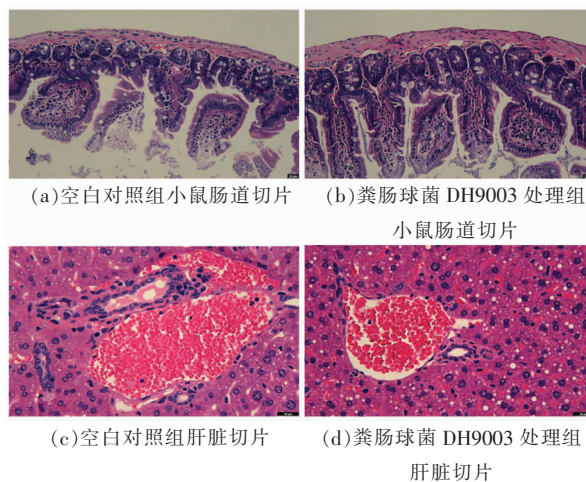
肠道是生物体吸收营养物质和阻挡有害组织的主要器官,同时也是机体最大的免疫器官,约 70% 的免疫细胞和免疫球蛋白都集中于此^[12]。肠道是否正常是评价机体健康状况的标准之一^[13]。图 2a 和 2b 分别为空白对照组和粪肠球菌处理组的小鼠肠道切片的显微镜图,结果显示两组小鼠的肠道上皮细胞均排列紧密,结构较为完整,肠腺上皮细胞与基底膜紧密结合,肠绒毛完整,未见明显



注:HD 为空白对照组,YD 为粪肠球菌 DH9003 处理组。

图 1 灌胃不同时间的小鼠粪便中有抑菌活性的细菌菌落总数

Fig.1 TVC of faces isolates with antimicrobial activity during intragastric administration period



(a)空白对照组小鼠肠道切片 (b)粪肠球菌 DH9003 处理组小鼠肠道切片
(c)空白对照组肝脏切片 (d)粪肠球菌 DH9003 处理组肝脏切片

图 2 小鼠组织切片观察结果

Fig.2 Observation results of mice tissue sections

异常。值得注意的是,粪肠球菌 DH9003 处理组的小鼠肠绒毛相对于空白对照组排列更为密集且肠绒毛的长度增加,这表明粪肠球菌 DH9003 对小鼠的肠道未产生负面影响,同时会对小鼠肠黏膜屏障有一定的改善作用。

肝脏健康是机体其它脏器健康的基础,具有分解潜在有害物质,调节稳定的内部环境的重要作用^[14]。评估小鼠肝脏的组织病理学变化能有效判定粪肠球菌 DH9003 是否会对机体产生不利影响。图 2c 和 2d 分别为空白对照组和处理组小鼠的肝脏切片显微镜观察图,结果发现空白对照组和粪肠球菌处理组的小鼠肝组织均结构均匀,未产生病变,说明 DH9003 未对小鼠肝脏产生有害影响。

2.3 粪肠球菌 DH9003 对小鼠肠道菌群物种多样性的影响

2.3.1 Alpha 多样性分析 稀疏曲线是 Alpha 多样性中一个重要指数,不仅用于评估微生物组测序量或样本量的饱和情况,而且可用来比较不同数量样本的物种丰富度^[15]。图 3 为空白对照组(HD)和粪肠球菌处理组(YD)测序的稀疏曲线。当样本测序深度增加到一定量时,曲线斜率平滑,变化较小,说明该样本量设置合理。随着测序深度的增加,YD 的物种丰富度整体低于 HD 的物种丰富度,这可能是因为在短时间内高剂量粪肠球菌 DH9003 持续进入肠道中,在肠道中定植并成为相对优势菌群,对其它菌种产生抑制,从而导致其物种丰富度降低。这与刘石等^[16]报道的添加复合益生菌导致物种丰富度低于对照组的的结果一致。

2.3.2 Beta 多样性分析 由 NMDS 分析可观察到生物学组内相似性及组间的差异性是否明显^[17]。如图 4 所示,每个点代表 1 个样本,不同颜色代表不同分组。两个样品间距离越近,说明样品中微生物群落差异越小,反之说明样品间微生物群落组成结构差异越大。本研究空白对照组和 DH9003 处理组的样本距离近,而灌胃后的样本距离远,说明实验有效。同时,随着灌胃时间的延长,样本的距离变远,说明灌胃粪肠球菌 DH9003 对小鼠肠道菌群分布有一定影响,需进一步分析。

2.3.3 物种组成分析 图 5 是不同处理组不同时间的小鼠粪便中微生物群落门水平的相对丰度。

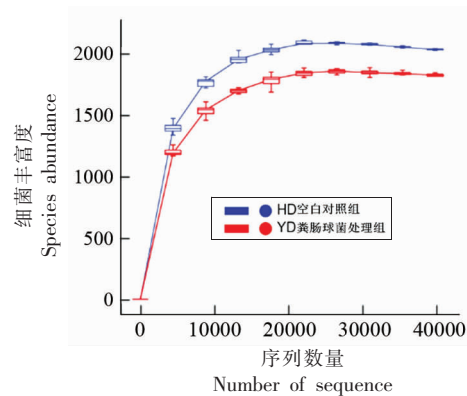


图 3 不同处理组样本的稀疏曲线

Fig.3 Sparse curves of samples in different treatment groups

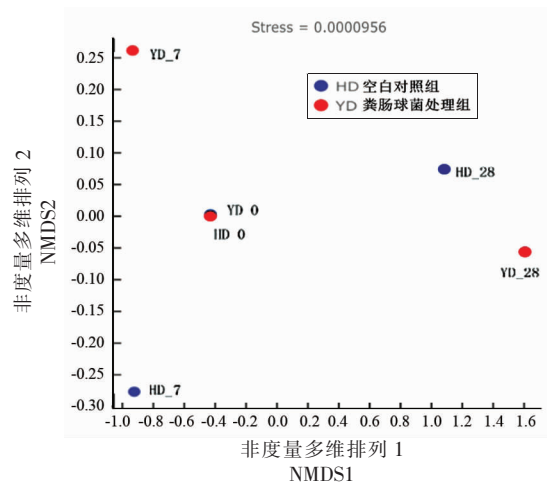


图 4 Beta 多样性分析

Fig.4 Analysis on Beta diversity

拟杆菌门(Bacteroidetes)和厚壁菌门(Firmicutes)为小鼠粪便中的优势菌门,2个细菌门的相对丰度总量达在93%以上,说明外源益生菌的补充对小鼠肠道的菌群结构有一定的调节作用,然而不能改变主要的优势菌群,这与陆文伟等^[18]的研究结果一致。同时,DH9003 处理组在门水平上的差异主要表现在拟杆菌门和厚壁菌门的变化,这与Vemuri等^[19]研究结果相似。空白对照组中,0,7 d和28 d厚壁菌门的相对丰度分别为37.13%,51.67%和41.86%。DH9003 处理组中,0,7 d和28 d厚壁菌门的相对丰度分别为40.17%,47.43%和63.58%。由此可见,空白对照组中,厚壁菌门的相对丰度随饲养时间的延长先增加后减少,说明新的环境可能会影响小鼠肠道菌群中厚壁菌门相对

丰度的变化,当适应一段时间后,肠道菌群中厚壁菌门的相对丰度又减少并恢复到稳定水平。粪肠球菌 DH9003 处理组中,厚壁菌门的相对丰度随着粪肠球菌灌胃时间的延长而不断增加,说明摄入 DH9003 后其在小鼠肠道中定植,并随灌胃时间的延长逐步成为肠道的优势菌群。

2.3.4 物种差异分析与标志物种 LefSe (LDA Effect Size)分析是一种差异分析方法,可以直接

对所有分类水平同时进行差异分析,寻找分组之间稳健的差异物种,在微生物宏基因组分析领域获得广泛的应用^[20]。图 6 为粪肠球菌 DH9003 处理组小鼠的物种分类学分支图。在粪肠球菌 DH9003 处理组中,肠球菌属 (*Enterococcus* spp.)是主要的差异物种。综合小鼠粪便中活性菌株的鉴定结果,推断摄入粪肠球菌 DH9003 对小鼠肠道菌群的丰度和多样性有潜在的影响。

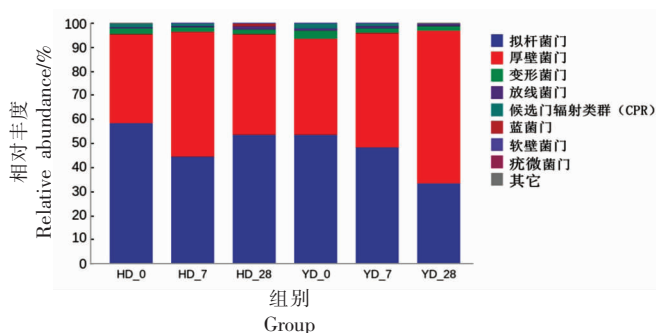


图 5 门水平上不同处理组不同时间的小鼠粪便中微生物菌群相对丰度

Fig.5 Relative abundance of microbial communities in feces of mice at different time points in different treatment groups at the phylum level

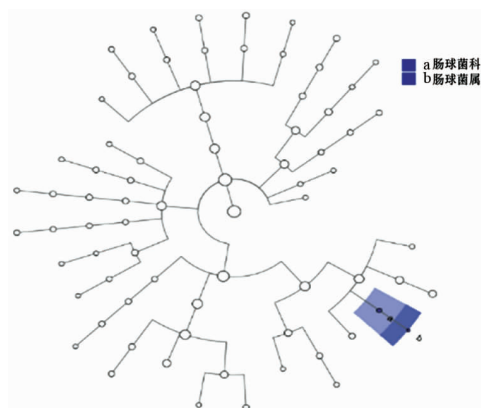


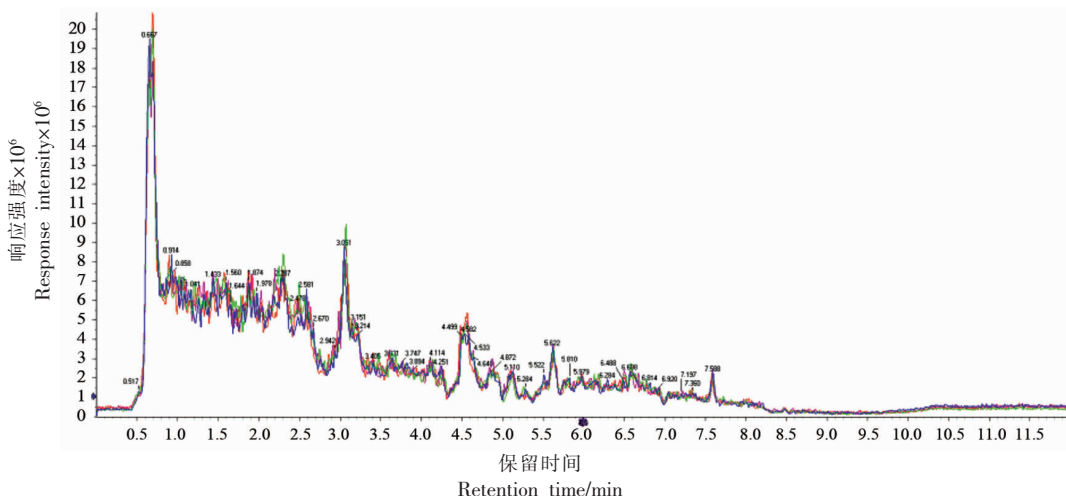
图 6 粪肠球菌 DH9003(YD)处理组的物种分类学分支

Fig.6 The branch of taxonomy of species of *E. faecalis* DH9003 (YD) treatment group

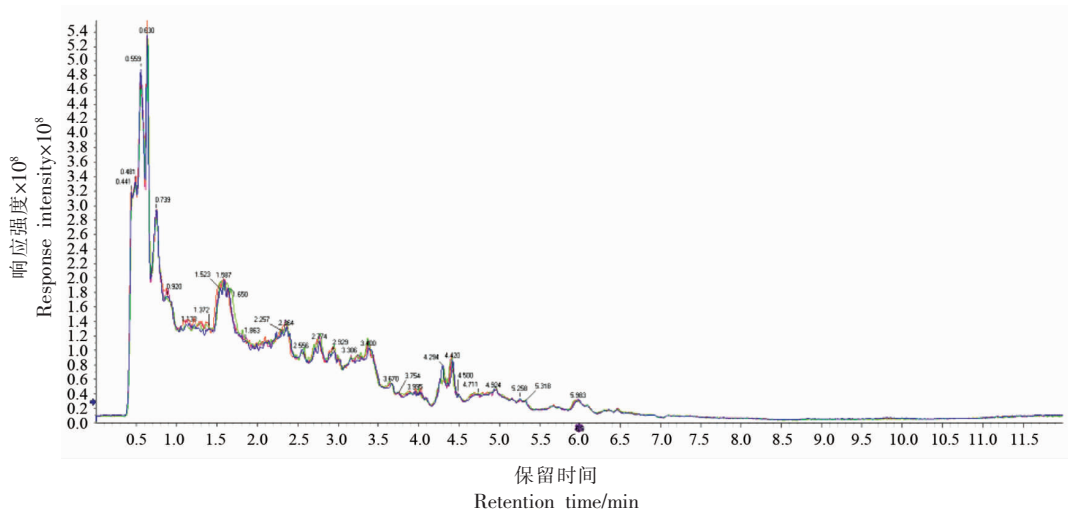
2.4 粪肠球菌 DH9003 对小鼠代谢的影响

2.4.1 代谢组学数据质控 图 7 为质控样本 (QC)的总离子流图重叠谱图(TIC)。QC 样本总离子流图的基线稳定,各色谱峰的相应强度和保留

时间基本重叠,说明试验过程中由仪器引起的变异较小,重复性好,所采集的样品数据可进行差异分析。



(a)正离子模式下的总离子流图重叠谱图



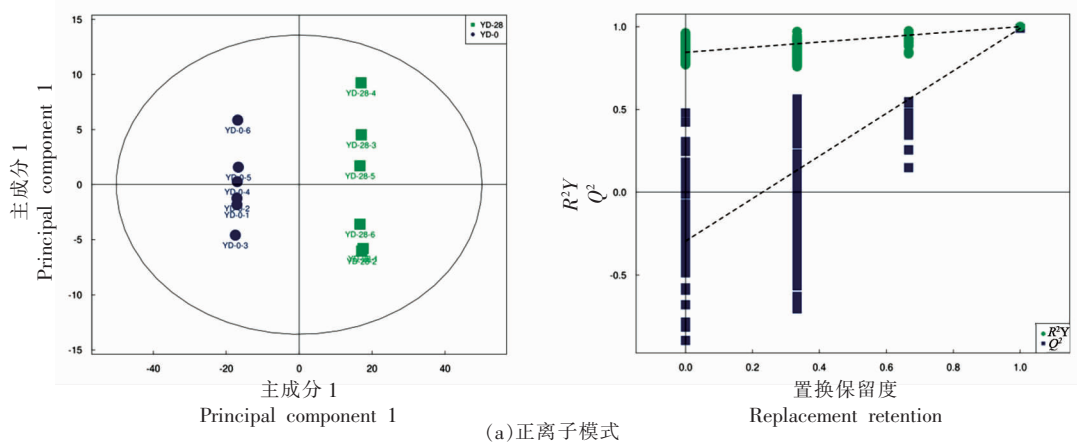
(b)负离子模式下的总离子流图重叠谱图

图 7 QC 样本总离子流图重叠谱图

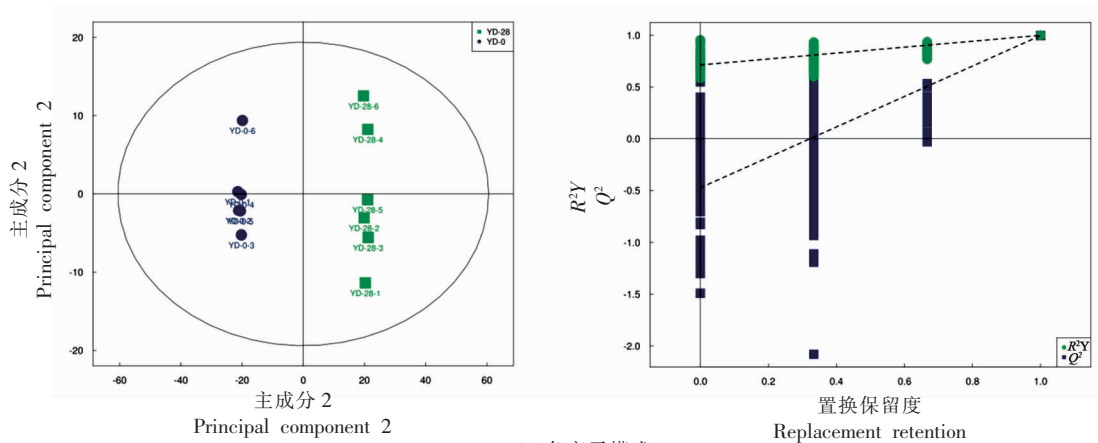
Fig.7 Total ion current overlapped chromatograms of quality control samples

2.4.2 正交偏最小二乘判别分析 为判别处理组 0 d 和 28 d 之间是否有差异,采用 OPLA-DA 分析

方法对两组进行分析。图 8 为处理组 0 d 和 28 d 的 OPLS-DA 得分图和置换检验图。结果表明:每



(a)正离子模式



(b)负离子模式

图 8 YD_0 VS YD_28 OPLS-DA 得分图和置换检验图

Fig.8 OPLS-DA score and permutation test chart of YD_0 VS YD_28

组的样品能较好地聚成一类, 两组间有明显的区分, 说明试验重复性较好。同时, 在正离子模式下, $R^2X=0.601$, $R^2Y=1$, $Q^2=0.99$, 负离子模式下, $R^2X=0.761$, $R^2Y=0.999$, $Q^2=0.996$, 这表明模型稳定可靠。为避免监督模型在建模过程中发生过拟合, 本试验采用置换检验对模型进行逆行检验以保证模型的有效性。随着置换保留度逐渐降低, 随机模型的 R^2 和 Q^2 逐渐下降, 说明原模型不存在过拟合

现象, 模型稳健性良好。

2.4.3 差异代谢物的筛选 采用 OPLS-DA VIP > 1 和 $P < 0.05$ 为显著性差异代谢物筛选标准, 初步筛选处理组 0 d 和 28 d 的差异代谢物, 共检出差异代谢物 254 种, 其中 124 种显著上调, 130 种显著下调。表 1 为粪肠球菌 DH9003 处理后小鼠粪便种的部分的差异代谢物。

表 1 部分差异代谢物统计表

Table 1 Partial different metabolite statistics

| 序号 | 代谢物 | VIP | 差异倍数(FC) | P 值 |
|----|---------------------|------|----------|-------|
| 1 | 12-酮脱氧胆酸 | 7.66 | 0.44 | 0 |
| 2 | 肌苷 | 6.79 | 0.35 | 0 |
| 3 | 鞘氨醇 | 6.58 | 1.96 | <0.01 |
| 4 | 尿胆素 | 6.49 | 5.49 | <0.01 |
| 5 | 脱氧腺苷 | 6.47 | 0.09 | <0.01 |
| 6 | 1-十六烷基-Sn-丙三基-3-磷胆碱 | 5.90 | 5.90 | 0 |
| 7 | (+)- α -生育酚 | 5.74 | 0.18 | 0 |
| 8 | 原亮氨酸 | 5.47 | 9.13 | 0 |
| 9 | 共卟啉 I | 5.10 | 25.56 | 0 |
| 10 | 原卟啉 IX | 5.01 | 86.76 | <0.01 |
| 11 | β -隐黄素 | 4.99 | 6.62 | 0 |
| 12 | α -醋酸甲酚酯 | 4.93 | 0.02 | 0 |
| 13 | 单脂素 | 4.80 | 0.02 | 0 |
| 14 | S-氟戊菊酯 | 4.68 | 108.12 | 0 |
| 15 | α -生育酚乙酸酯 | 4.54 | 0.02 | 0 |
| 16 | N-甲基-L-谷氨酸 | 4.43 | 341.6 | 0 |
| 17 | 亚油酰乙醇胺 | 4.27 | 0.052 | 0 |
| 18 | 硫胺素 | 4.02 | 0.17 | 0 |
| 19 | 2-乙基己基酯 | 3.83 | 10.83 | 0 |
| 20 | 双乙酰吡嗪醇 | 3.54 | 6.22 | 0 |
| 21 | D-木糖 | 3.32 | 6.62 | <0.01 |
| 22 | 4- α -羟基司坦唑醇 | 3.30 | 0.36 | 0 |
| 23 | 3-甲基腺嘌呤 | 3.03 | 4.37 | <0.01 |
| 24 | 9,12-十八碳二烯酸 | 3.02 | 0.27 | 0 |
| 25 | 左旋肉碱 | 2.99 | 2.51 | 0 |
| 26 | 二十碳四烯酸 | 2.91 | 0.21 | 0 |
| 27 | 7-甲基鸟嘌呤 | 2.90 | 4.31 | <0.01 |
| 28 | 醛固酮 | 2.83 | 5.21 | 0 |
| 29 | 咪唑烟酸 | 2.82 | 0.08 | 0 |
| 30 | 甜菜碱 | 2.82 | 0.33 | 0 |
| 31 | 三尖杉酯碱 | 2.81 | 27.1 | 0 |
| 32 | 亚油酸 | 2.81 | 0.29 | 0 |
| 33 | 乙酰肉毒碱 | 2.66 | 20.65 | 0 |
| 34 | 麦芽糖 | 2.57 | 0.25 | 0 |

2.4.4 差异代谢 KEGG 通路分析 KEGG 富集分析是以 KEGG 通路为单位, 以该物种或亲缘关系较近的物种所参与的代谢通路为背景, 通过 Fisher

精确检验(Fisher's exact test)分析计算各通路代谢物富集的显著性水平, 从而确定受到显著影响的代谢和信号转导途径^[21]。图 9 为显著性最高的

前 20 条的差异表达代谢物 KEGG 富集通路图。显著性水平较高的代谢通路有 ABC 转运蛋白和蛋

白消化吸收通路，包含的差异代谢物数量分别是 31 个和 12 个。

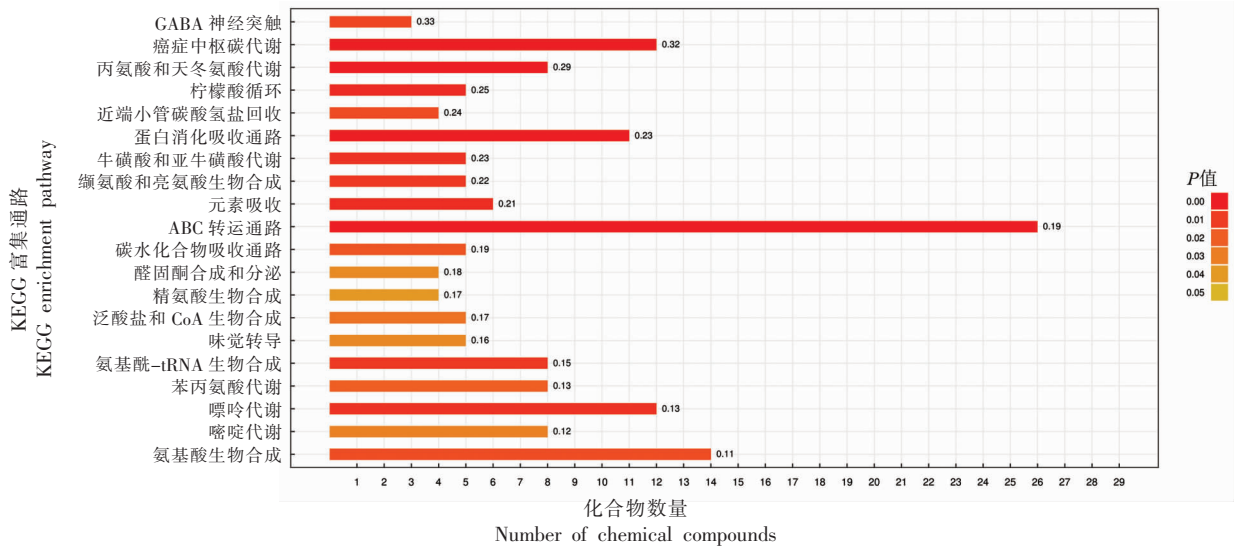


图 9 差异表达代谢物 KEGG 富集通路图

Fig.9 KEGG enriched pathway of differentially expressed metabolites

图 10 为 ABC 运输通路的代谢物热图和蛋白消化吸收通路的代谢物热图。通过颜色变化反映每种代谢物的变化程度,红色表示显著上调,蓝色表示显著下调,颜色深浅反应上、下调程度。综合图 10 结果发现,D-谷氨酰胺、L-亮氨酸、天冬氨

酸、苯酚、谷氨酸、L-天冬氨酸在两组代谢变化中都呈现显著上调的结果。相应的,两组结果中丙酸、丙氨酸、丁酸、脯氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸呈显著下调现象。

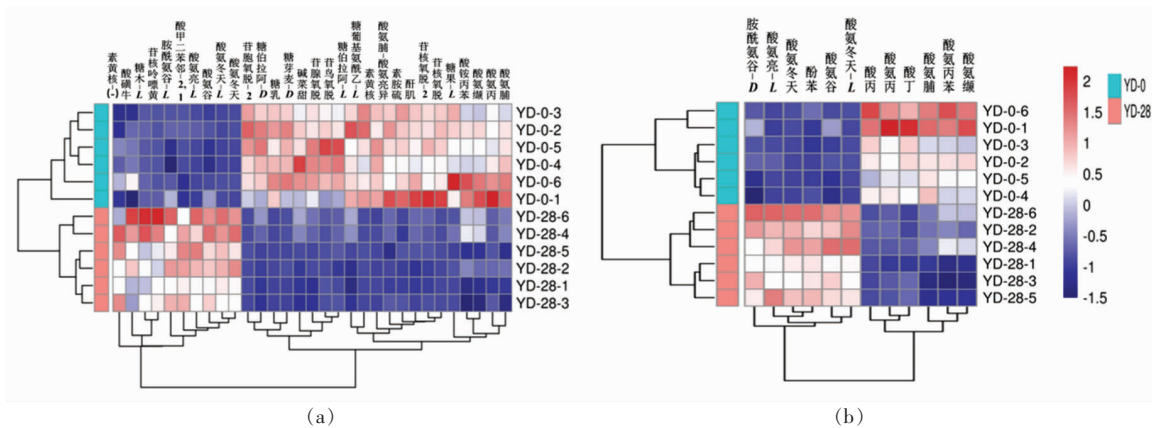


图 10 ABC 运输通路(a)和蛋白消化吸收通路(b)的代谢物热图

Fig.10 Metabolite thermograms of ABC transport pathway (a) and protein digestive absorption pathway (b)

3 结论

用产细菌素 Enterocin Y3 粪肠球菌灌胃健康 C57 小鼠 28 d,研究该菌株在小鼠体内的定植、病理学以及对小鼠肠道菌群和代谢能力的影响。小

鼠粪便中细菌抑菌活性测定结果表明灌胃后 0~7 d,DH9003 在小鼠体内大量定植,在 7~28 d,粪肠球菌 DH9003 数量缓慢增加并趋于稳定。肠道、肝脏组织切片观察表明:摄入粪肠球菌 DH9003 使

小鼠的肠黏膜更为密集且长度增加,对小鼠肠黏膜有一定的改善作用,且未对肝脏产生有害影响和损伤。微生物多样性分析结果说明补充粪肠球菌 DH9003 能在一定程度上调节小鼠的肠道菌群结构,在门水平上的差异变化主要是拟杆菌门和厚壁菌门的改变。物种组成分析结果表明,空白对照组中,0,7 d 和 28 d 厚壁菌门的相对丰度分别为 37.13%,51.67%和 41.86%,厚壁菌门的相对丰度随饲养时间的延长先增加后减少,说明新环境可能刺激小鼠肠道菌群中厚壁菌门相对丰度的变化,而当适应一段时间后,肠道菌群中厚壁菌门的相对丰度减少并恢复到稳定水平。粪肠球菌 DH9003 处理组中,0,7 d 和 28 d 厚壁菌门的相对丰度分别为 40.17%,47.43%和 63.58%,厚壁菌门的相对丰度随粪肠球菌灌胃时间的延长而不断增加,说明摄入粪肠球菌 DH9003 后其在小鼠肠道中定植,并随灌胃时间的延长逐步成为肠道的优势菌群。LEfSe 分析结果表明肠球菌属(*Enterococcus* sp.) 是主要的差异物种,说明粪肠球菌 DH9003 的摄入对小鼠肠道菌群的丰度和多样性有潜在影响。代谢组学结果表明,灌胃粪肠球菌 DH9003 前和灌胃 28 d 后,共检出 254 种差异代谢物,其中 124 种显著上调,130 种显著下调。基于 KEGG 通路富集分析发现显著性水平较高的代谢通路有 ABC 转运蛋白和蛋白消化吸收通路。上述结果说明该菌株安全无害且对宿主的肠道菌群结构和代谢能力有一定的调节作用,研究结果为益生菌资源的利用提供了技术支持。

参 考 文 献

- [1] DALZINI E, COSCIANI-CUNICO E, BERNIN V, et al. Behaviour of *Escherichia coli* O157 (VTEC), *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* during the manufacture, ripening and shelf life of low fat salami[J]. Food Control, 2015, 47(1): 306-311.
- [2] DESANTIS Z, HUGENHOLTZ P, LARSEN N, et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(7): 5069-5072.
- [3] BHAT I, SINGH K, SHARMA D, et al. Adherence capability and safety assessment of an indigenous probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* MTCC-5897[J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 130(5): 120-130.
- [4] 迟海,李学英,徐春霞,等.产细菌素乳酸菌的筛选、鉴定及抑菌特性研究[J].中国食品学报,2020,20(7): 1-8.
CHI H, LI X Y, XU C X, et al. Screening, identification and bacteriostatic characteristics of bacteriocin producers from lactic acid bacteria[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(7): 1-8.
- [5] EL-GENDYA O, BREDE D A, ESSAM T M, et al. Purification and characterization of bacteriocin-like inhibitory substances from food isolated *Enterococcus faecalis* OS13 with activity against nosocomial enterococci[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 3795-3807.
- [6] CHI H, HOLO H. Synergistic antimicrobial activity between the broad spectrum bacteriocin garvicin KS and Nisin, Farnesol and Polymyxin B against gram-positive and gram-negative bacteria[J]. Current Microbiology, 2018, 75(1): 272-277.
- [7] 杨珍珠,潘秭琪,迟海,等.羊奶源产细菌素乳酸菌筛选,鉴定及益生特性研究[J].中国食品学报,2021,21(11): 71-77.
YANG Z Z, PAN Z Q, CHI H, et al. Screening, identification and probiotic characteristics of bacteriocin-producing strains of lactic acid bacteria from goat milk[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(11): 71-77.
- [8] 迟海,李学英,杨宪时,等.南极大磷虾 0,5 和 20 °C 贮藏中的品质变化[J].海洋渔业,2010,32(4): 447-453.
CHI H, LI X Y, YANG X S, et al. Sensory, microbiological and chemical changes of *Euphausia superba* during storage at 0, 5, and 20 °C[J]. Marine Fisheries, 2010, 32(4): 447-453.
- [9] SADEGHIPOUR A, BABAHEIDARIAN P. Making formalin-fixed, paraffin embedded blocks[J]. Methods Mol Biol, 2019, 1897(12): 253-268.
- [10] CAPORASO G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335-336.

- [11] KINROSS J, MUIRHEAD J, MIRNEZAMI R, et al. Mo1905 Microbiome–metabome linked analysis of ascending colon cancer by ¹H NMR MAS spectrometry and 16S rRNA gene analysis (metataxonomics) [J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(5): 688–699.
- [12] 臧凯丽, 任效东, 王秋萍, 等. 益生菌胞外蛋白与肠道粘膜免疫细胞相互作用关系的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(14): 346–351.
ZANG K L, REN X D, WANG Q P, et al. Progression of the interaction between probiotic proteins and intestinal mucosal immunity [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(14): 346–351.
- [13] 秦廷洋, 代军, 马晓春, 等. 衰老对大鼠肠道组织形态及自噬水平的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(16): 4042–4045.
QIN T Y, DAI J, MA X C, et al. Effects of aging on intestinal morphology and autophagy in rats [J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2019, 39(16): 4042–4045.
- [14] 刘冬, 姚文兵, 张健, 等. 富锗金针菇多糖对小鼠肝脏的保护作用[J]. *中国药科大学学报*, 2006, 37(6): 565–568.
LIU D, YAO W B, ZHANG J, et al. Protective effects of *Flammulina velutipes* polysaccharides containing germanium on mice liver [J]. *Journal of China Pharmaceutical University*, 2006, 37(6): 565–568.
- [15] 杨珍珠, 赵明, 迟海, 等. 南极大磷虾共附生细菌多样性及其防御功能研究[J]. *海洋渔业*, 2022, 44(1): 78–86.
YANG Z Z, ZHAO M, CHI H, et al. Diversity and defense function of symbiotic bacteria from *Euphausia superba* [J]. *Marine Fisheries*, 2022, 44(1): 78–86.
- [16] 刘石, 刘静, 陈庄, 等. 饮水中添加复合益生菌对岭南黄羽肉鸡生长性能和肠道微生物菌群结构的影响[J]. *中国畜牧兽医*, 2022, 49(1): 98–108.
LIU S, LIU J, CHEN Z, et al. Effects of compound probiotics added to drinking water on growth performance and intestinal microflora in Lingnan yellow feather broilers [J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2022, 49(1): 98–108.
- [17] 贺燕, 黄先智, 韦峥, 等. 桑叶生物碱对 D-半乳糖诱导小鼠肠道菌群紊乱的调节作用[J]. *食品科学*, 2022, 43(5): 118–126.
HE Y, HUANG X Z, WEI Z, et al. Regulatory effect of mulberry leaf alkaloid on D-galactose-induced intestinal flora disturbance in mice [J]. *Food Science*, 2022, 43(5): 118–126.
- [18] 陆文伟, 杨震南, 丁历伟, 等. 益生菌 *Lactobacillus paracasei* LC01 对小鼠肠道菌群的调节作用[J]. *食品科学*, 2016, 37(23): 230–235.
LU W W, YANG Z N, DING L W, et al. Evaluation of intestinal microbiota in mice after oral administration of *Lactobacillus paracasei* LC01 [J]. *Food Science*, 2016, 37(23): 230–235.
- [19] VEMURI R, GUNDAMARAJU R, SHINDE T, et al. *Lactobacillus acidophilus* DDS-1 modulates intestinal-specific microbiota, short-chain fatty acid and immunological profiles in aging mice [J]. *Nutrients*, 2019, 11(6): 1297.
- [20] SEGATA N, IZARD J, WALDRON L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation [J]. *Genome Biology*, 2011, 12(6): R60.
- [21] HAKIMI A A, REZNIK E, LEE C H, et al. An integrated metabolic atlas of clear cell renal cell carcinoma [J]. *Cancer Cell*, 2016, 29(1): 104–116.

Effects of an Enterocin Y3 Producing Strain of *Enterococcus faecalis* DH9003 on Intestinal Flora Modification and Metabolic Function of Mice

Yang Zhenzhu^{1,2}, Tao Leren², Zhao Lukai^{1,2}, Wang Yuan¹, Chi Hai^{1,2*}

¹East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090

²School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093)

Abstract To explore the potential probiotic effect of an Enterocin Y3 producing strain of *Enterococcus faecalis* DH9003, about 15 healthy C57 male mice were intragastrically administered with sterile saline (control group, $n=7$) and *E. faecalis* DH9003 (treatment group, $n=8$). After 4 weeks, the feces of mice were collected to determine the effect of *E. faecalis* DH9003 on intestinal flora modification and metabolic function of mice. The results showed that *E. faecalis* DH9003 were colonized in large quantities in mice within 7 days after intragastric administration. The number of the

strain increased slowly and became stable at 7–28 days. By observing the pathological characteristics of the intestinal and liver tissue sections of mice, the intake of *E. faecalis* DH9003 had a certain improvement effect on the intestinal mucosa barrier of mice, indicating that the strain made the intestinal mucosa of mice denser and longer. Meanwhile, the strain showed no pernicious influence on the livers of mice. The intragastric administration of *E. faecalis* DH9003 led to the different diversity of the treated group, and became the dominant species among different groups. The supplement of *E. faecalis* DH9003 had a certain regulatory effect on the bacterial community structure modification in the intestinal tract of mice, and the modification at the phylum level was the differences of relative abundance between Bacteroidetes and Firmicutes. A total of 254 differential metabolic substances were detected between control and treatment group, and 124 differential metabolic substances were up-regulated and 130 differential ones in turn were down-regulated. The enrichment analysis of KEGG pathway showed that the metabolic pathways with high levels of visibility included ABC transporter proteins and protein digestion and absorption pathways. In summary, *E. faecalis* DH9003 could be colonized *in vivo* and effect on intestinal flora and metabolic ability of the host in some degree.

Keywords *Enterococcus faecalis*; Enterocin Y3; intestinal flora; metabolomics; tissue sections