

广叶绣球菌多糖对染铅小鼠肠道屏障损伤的缓解作用

冯 嫣¹, 梁国栋², 乔瑶瑶², 李嘉欣², 乔泽宁², 云少君^{2,3}, 程菲儿^{2,3},
程艳芬^{2,3}, 曹谨玲^{2,3}, 冯翠萍^{2*}

(¹ 吕梁学院生物与食品工程系 山西吕梁 033000

² 山西农业大学食品科学与工程学院 山西太谷 030801

³ 黄土高原食用菌山西省重点实验室 山西太谷 030801)

摘要 目的:探究同笼饲养方式下广叶绣球菌多糖(HSCPs)对染铅小鼠肠道屏障损伤的缓解机制。方法:60只昆明小鼠被随机分为空白对照组(NC)、染铅模型组(Pb)、HSCPs组、染铅组和HSCPs组同笼饲养组(CO-Pb+CO-HSCPs组)。饲养8周后,以全自动血细胞分析仪测定红细胞和血红蛋白质量浓度;电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP-MS)测定小鼠全血、小肠、粪便中铅的含量;ELISA试剂盒检测血清中脂多糖含量及小肠溶菌酶、 β -防御素和免疫球蛋白A(sIgA)的水平;HE染色和阿利新蓝-过碘酸-雪夫染色(AB-PAS)观察小肠组织显微结构和杯状细胞的数量;qPCR法测定小肠中ZO-1、ZO-2、Occludin、Claudin-1、Lyz、Ang4 mRNA表达量;16S rRNA扩增子测序分析肠道微生物;代谢组学分析血清中内源性代谢物的变化。结果:与NC组比,Pb组血铅、小肠铅、粪便铅及血清脂多糖含量、脱硫弧菌的相对丰度显著升高($P<0.05$);红细胞数量、血红蛋白浓度、溶菌酶、 β -防御素、sIgA含量及ZO-1、ZO-2、Occludin、Claudin-1、Lyz、Ang4 mRNA表达量、毛螺菌属_NK4A136_group、拟普雷沃菌属、肠道细菌的相对丰度显著下降($P<0.05$);小肠绒毛变短,出现断裂、脱落,且绒毛之间间隙增大,杯状细胞明显减少。与Pb组比,CO-Pb组血铅、小肠铅含量、脱硫弧菌属的相对丰度均显著下降($P<0.05$),红细胞数量和血红蛋白浓度、粪杆菌属的相对丰度显著升高($P<0.05$),溶菌酶、 β -防御素、sIgA含量、ZO-1、ZO-2、Occludin、Claudin-1、Lyz、Ang4 mRNA表达量差异不显著,小肠绒毛较短、断裂,杯状细胞较少;HSCPs组毛螺旋菌科_NK4A136_group菌属、粪杆菌属的相对丰度显著升高($P<0.05$);HSCPs、CO-HSCPs组血清脂多糖、血铅、小肠铅含量、脱硫弧菌属的相对丰度均显著下降($P<0.05$),血红蛋白浓度、粪便铅含量、溶菌酶、 β -防御素、sIgA含量、ZO-1、ZO-2、Occludin、Claudin-1、Lyz、Ang4 mRNA表达量、拟普雷沃氏菌属的相对丰度显著升高($P<0.05$),小肠绒毛变长,排列较整齐,杯状细胞明显增加。同笼饲养下主要有14个差异代谢物,涉及甘油磷脂通路、花生四烯酸通路、亚油酸通路等7个代谢途径。结论:同笼饲养可通过将CO-HSCPs组小鼠的菌群转染给CO-Pb组小鼠,增加CO-Pb组小鼠有益菌的相对丰度,影响甘油磷脂通路、花生四烯酸通路、亚油酸通路等7个代谢途径,改善铅所致小鼠肠道屏障损伤。

关键词 同笼饲养;广叶绣球菌多糖;铅;肠道屏障;代谢组学

文章编号 1009-7848(2024)11-0147-16 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.11.015

肠道菌群与宿主生理状况密切相关,而同笼饲养会影响肠道菌群的丰度和多样性^[1]。铅作为难降解的重金属污染物,进入消化道后主要在肠道吸收,然后转运至机体全身。研究表明,铅暴露会引起肠道受损^[2],肠黏膜脱落,肠绒毛断裂^[3],肠道炎症^[4],还会影响肠道微生物的组成及多样性^[5-6]。

目前,铅中毒的治疗主要是利用螯合剂,如乙二胺四乙酸盐和二巯基琥珀酸,然而会带来一系列的副作用^[7]。开发天然来源的通过促进排铅进而改善肠道屏障的活性物质具有重要的意义。

多糖具有广泛的生物学效应,能够直接影响机体的物质和能量代谢^[8-9]。研究表明,姬松茸多糖^[10]、海藻多糖^[11]、枸杞多糖^[12]、岩藻多糖^[13]等均有促进的排铅作用。多糖进入人体后被肠道菌群利用,降解成机体可以吸收利用的物质^[8]。这些物质可进一步调节肠道菌群的组成,改善肠道生物学功能^[14]。广叶绣球菌(*Sparassis latifolia*)是一种珍稀名贵的食药两用菌,其多糖含量非常丰富,达39.3%~43.6%,为菇类之最^[15-16]。本课题组前期对

收稿日期:2023-11-13

基金项目:山西省基础研究计划自然科学面上项目(202103021224126);食用菌山西省科技创新团队项目(201805D131009);山西省高等学校科技创新计划项目(2023L375)

第一作者:冯嫣,女,硕士,副教授

通信作者:冯翠萍 E-mail: ndfcp@163.com

广叶绣球菌多糖 (*Sparassis latifolia* polysaccharides, HSCPs) 进行分离纯化和结构表征, 得到一种物质, 该分子的分子质量为 6 456 u、是由 β -(1 \rightarrow 3)-D-葡聚糖和 β -(1 \rightarrow 6)-D-葡聚糖聚合形成的 β -葡聚糖, 由物质的量比分别为 13:4:1:2:3 的葡萄糖、甘露糖、半乳糖、木糖、果糖组成^[17]。此外, HSCPs 具有调节免疫^[18-19], 降血脂^[20], 抗肿瘤^[21-22]及抗氧化^[23]等生理作用, 而以其干预小鼠, 并与铅暴露小鼠同笼饲养是否对肠道屏障产生影响有待探讨。

基于此, 本试验通过构建染铅小鼠模型, 以 HSCPs 对其进行干预, 将染铅小鼠与 HSCPs 小鼠同笼饲养, 测定小鼠肠道屏障功能的相关指标, 并结合肠道菌群和代谢组学综合探讨同笼饲养方式下绣球菌多糖对染铅小鼠肠道屏障损伤的缓解作用。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

广叶绣球菌, 由山西省清徐县太和食用菌栽培基地提供。

苏木精-伊红 (HE) 染色液、RNAiso plus、Prime ScriptTMRT Master Mix、SYBR[®] Premix Ex Taq TM II, 北京索莱宝科技有限公司; 小鼠 LPS、LZM、 β -防御素、sIgA ELISA 试剂盒, 上海江莱生物科技有限公司; 乙酸铅, 天津市大茂化学试剂厂; 硝酸、高氯酸等均为国产分析纯级, 天津市大茂化学试剂。

1.2 主要仪器

Optima 5300DV 型电感耦合等离子发射光谱仪, 美国 PE 公司; 石墨消解仪, 天津云祥仪器有限公司; LEI-CARM2245 切片机, 德国 Leica 公司; 光学显微镜, 北京顺能电子仪器有限公司; Septra-max i3X 酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; Eppendorf centrifuge 5417R 冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司。

1.3 方法

1.3.1 绣球菌多糖的制备 参照本课题组前期方法^[17]提取 HSCPs, 采用苯酚-硫酸法对总糖含量进行测定。

1.3.2 动物分组及处理 3 周龄 SPF 级雄性昆明

小鼠, 购于斯贝福(北京)生物技术有限公司[许可证号: SCXK(京)2019-0010]。将小鼠饲养于山西农业大学实验动物管理中心, 许可证号[SYXK(晋)2020-0003]。小鼠在适宜环境(温度为 22 ℃, 湿度为 55%, 光照强度为 20 lx, 明暗交替为 12 h/12 h)下, 自由饮水, 进食, 适应性喂养 7 d 后, 随机分为 5 组: 空白对照组(NC)、染铅模型组(Pb)、HSCPs 组, 染铅组和 HSCPs 组同笼饲养组(CO-Pb+CO-HSCPs), 每组 15 只。除 NC 组外, 其余小鼠均给予含 1 g/L Pb²⁺的水溶液作为饮用水, 以建立染铅小鼠模型。HSCPs、CO-HSCPs 组小鼠每天灌胃 400 mg/(kg·bw) 的 HSCPs, 每天 1 次; NC、Pb 和 CO-Pb 组灌胃相同体积的生理盐水。试验 8 周后, 将小鼠禁食 12 h 后处死, 采集血液、小肠、盲肠内容物及粪便样品。

1.3.3 小鼠红细胞、血红蛋白及血清脂多糖含量的测定 利用全自动血细胞分析仪测定全血中红细胞和血红蛋白浓度; 按照试剂盒说明书测定血清脂多糖含量。

1.3.4 小鼠全血、小肠、粪便中铅含量的测定 取适量全血、小肠、粪便样品置于消化管中, 参照《食品安全国家标准 食品中铅的测定》(GB 5009.12-2017)中的方法, 采用石墨消解仪湿法消解样品, 利用电感耦合等离子发射光谱仪(ICP-MS)测定样品中的铅含量。

1.3.5 小肠组织显微结构观察 将在 4%多聚甲醛中固定 24 h 的小肠组织取出, 经流水冲洗后, 以不同浓度酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋后, 进行切片(5 μ m), 苏木精-伊红染液染色, 中性树胶封片, 显微镜拍照观察小肠组织结构。

1.3.6 小肠杯状细胞的测定 石蜡切片经阿利新蓝染色液染色 15 min, 蒸馏水洗 3 次, 每次 1 min; PAS 氧化剂中氧化 5 min, 自来水冲洗, 蒸馏水洗 2 次, 每次 1 min; Schiff 染色液浸染 15 min, 流水冲洗 10 min; 苏木素染色液染核 2 min, 水洗; 酸性分化液分化 5 s, 水洗; Scott 蓝化液返蓝 3 min, 水洗 3 min; 梯度浓度乙醇脱水, 二甲苯透明; 最后经中性树胶封片, 显微镜拍照观察小肠杯状细胞。

1.3.7 小肠组织溶菌酶、 β -防御素、sIgA 含量的测定 分别按照溶菌酶、 β -防御素和 sIgA 试剂盒的

操作说明测定含量。

1.3.8 小肠肠道屏障相关基因的测定 称取适量小肠组织,放到预先冷冻在 -80°C 的研钵中,立即加入液氮,加速研磨成粉末后装入 EP 管中,并加入 1 mL RNAiso plus,按照试剂盒说明书提取总 RNA,用核酸蛋白检测仪测定 RNA 浓度及纯度。按照 Prime ScriptTM RT Master Mix 说明书将 RNA 逆转录合成 cDNA。使用 SYBR[®] Premix Ex

TaqTM II 试剂盒在 MxPro-MX3000P 荧光定量 PCR 仪进行 qPCR,反应体系为:1 μL cDNA、5 μL SYBR[®] Premix Ex Taq II、上游引物与下游引物各 0.4 μL 、3.2 μL ddH₂O。反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 90 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,40 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。用 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 法计算目的基因的相对表达量。引物信息见表 1。

表 1 引物序列、产物大小

Table 1 Primer sequences and corresponding PCR product size

基因	编号	引物序列(5'-3')	长度/bp
<i>β-actin</i>	NM_007393.5	上游:GTGACGTTGACATCCGTAAGA 下游:GTAACAGTCCGCCTAGAAGCAC	287
<i>ZO-1</i>	NM_001163574.1	上游:CGCCTTCATACAATAAAGCAAATCATAG 下游:ACTGCGCATAATTAAGACGATCAAC	94
<i>ZO-2</i>	NM_011597.5	上游:AACATGTCTCTAACGGATGCT 下游:TTCCGAGATATCCTCCACTTCAG	144
<i>Occludin</i>	NM_001360538.1	上游:GAGCTTACAGGCAGAACTAGACG 下游:CTGCAGATCCCTTAACTTGCTT	143
<i>Claudin-1</i>	NM_016674.4	上游:CCCCATCAATGCCAGGTA 下游:GGACAGGAGCAGGAAAGTAGGAC 下游:ACCCAGGGAATTCAAATGCTC	103
<i>Lyz</i>	NM_013590.4	上游:GGCTACCGTGCTCAAGCTG 下游:TTCGGTCTCCACGGTTGTAGT	97
<i>Ang4</i>	NM_177544.4	上游:CTGGCTCAGAATGAAAGGTACG 下游:ATCTTTGCAAGGCCGAGTTAG	126

1.3.9 小鼠肠道菌群的测定 取适量小鼠盲肠内容物于干燥灭菌的冻存管中,液氮中保存样品后送诺禾致源科技股份有限公司进行高通量测序分析。

1.3.10 小鼠代谢产物的测定 取 100 μL 血清,加 300 μL 甲醇及 20 μL 内标,混匀后低温超声 10 min, -20°C 冰箱中静置 1 h 后高速离心,检测上清液。

1.4 数据处理及分析

数据用平均值 \pm 标准差的方式表示。采用 Graphpad Prism 软件进行作图,利用 SPSS 软件进行差异显著性分析。 $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

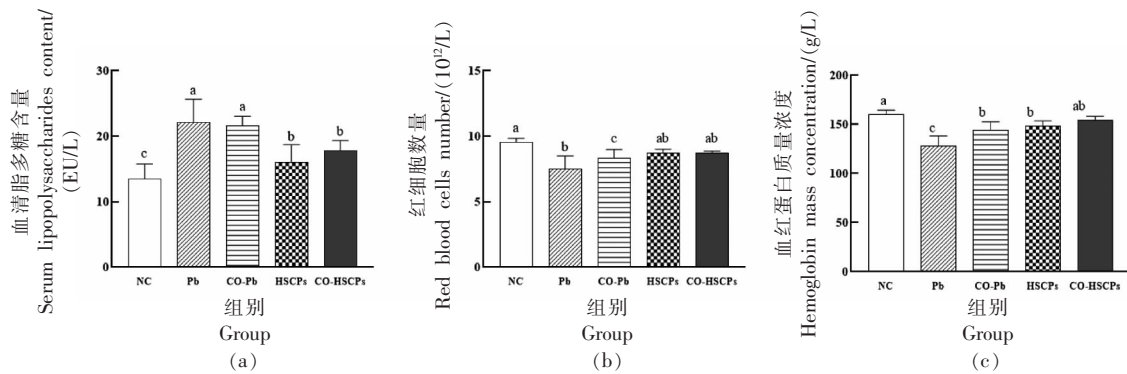
2.1 小鼠红细胞、血红蛋白及血清脂多糖水平的测定

由图 1 可知,与 NC 组相比,Pb 组血清脂多糖含量显著升高($P<0.05$),红细胞数量和血红蛋白质量浓度显著降低($P<0.05$)。与 Pb 组相比,CO-Pb 组血清脂多糖含量虽然降低,但差异不显著,红细胞数量和血红蛋白浓度显著升高($P<0.05$);HSCPs、CO-HSCPs 组血清脂多糖含量显著降低($P<0.05$),血红蛋白浓度显著升高($P<0.05$)。CO-HSCPs 相较于 CO-Pb,血清脂多糖含量显著降低($P<0.05$),血红蛋白浓度虽然升高,但差异不显著。

2.2 小鼠血、小肠、粪便中铅含量

由图2可知,与NC组相比,Pb组血铅、小肠铅、粪便铅含量显著升高($P<0.05$)。与Pb组相比,CO-Pb组血铅、小肠铅含量显著降低($P<0.05$);

HSCP_s、CO-HSCP_s组血铅、小肠铅含量显著降低($P<0.05$),粪便铅含量显著升高($P<0.05$)。相较于CO-Pb组,CO-HSCP_s组血铅、小肠铅含量显著降低($P<0.05$),粪便铅含量显著升高($P<0.05$)。



注:不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),下同。

图1 血清脂多糖水平、小鼠红细胞数量及血红蛋白质量浓度

Fig.1 The red blood cell numbers, hemoglobin mass concentration, and serum lipopolysaccharide levels in mice

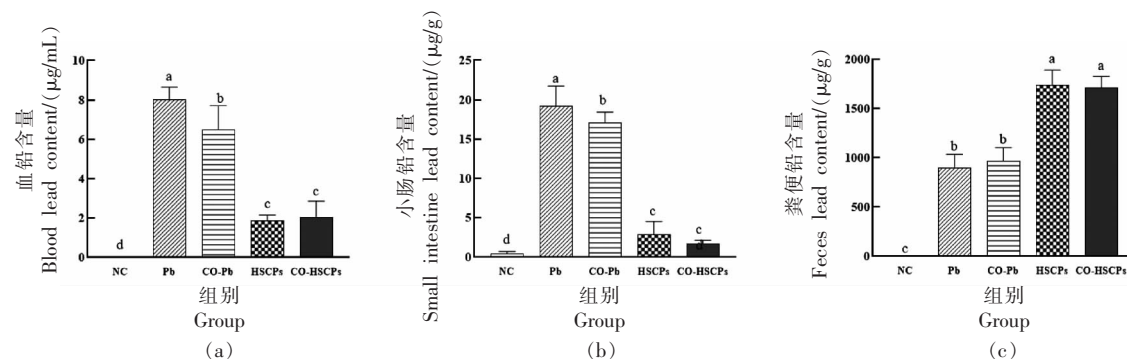


图2 小鼠血液、小肠、粪便中的铅含量

Fig.2 The Pb contents in blood, small intestine, and feces of mice

2.3 小肠组织显微结构观察

如图3所示,NC组小鼠小肠绒毛排列整齐、细长紧密且完整;与NC组相比,Pb组小鼠小肠绒毛变短,出现断裂、脱落,且绒毛之间间隙大。与Pb组相比,CO-Pb组的小肠绒毛较短、断裂;HSCP_s、CO-HSCP_s组小鼠小肠绒毛变长,排列较整齐,小肠绒毛形态有一定的缓解。

2.4 小肠杯状细胞数量的测定

如图4可知,与NC组相比,Pb组杯状细胞明显减少。与Pb组相比,CO-Pb组杯状细胞较少;HSCP_s、CO-HSCP_s组杯状细胞明显增加。

2.5 小肠组织溶菌酶、 β -防御素、sIgA含量的测定

由图5可知,与NC组相比,Pb组溶菌酶、 β -防御素、sIgA含量显著降低($P<0.05$)。与Pb组相比,CO-Pb组溶菌酶、 β -防御素、sIgA含量差异不显著;HSCP_s、CO-HSCP_s组溶菌酶、 β -防御素、sIgA含量显著升高($P<0.05$)。CO-HSCP_s组溶菌酶、 β -防御素、sIgA含量显著高于CO-Pb组($P<0.05$)。

2.6 小肠肠道屏障相关基因的测定

如图6所示,与NC组相比,Pb组ZO-1、ZO-

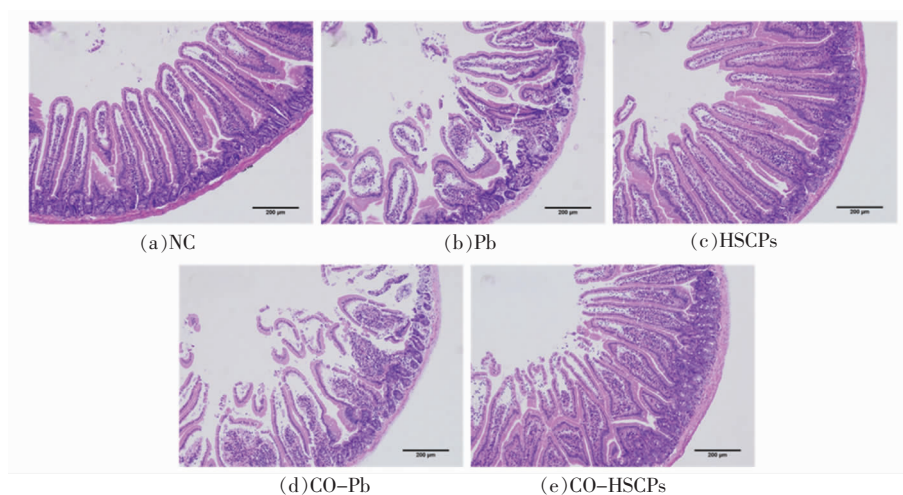


图 3 小鼠小肠 HE 染色结果

Fig.3 HE staining results of small intestine in mice

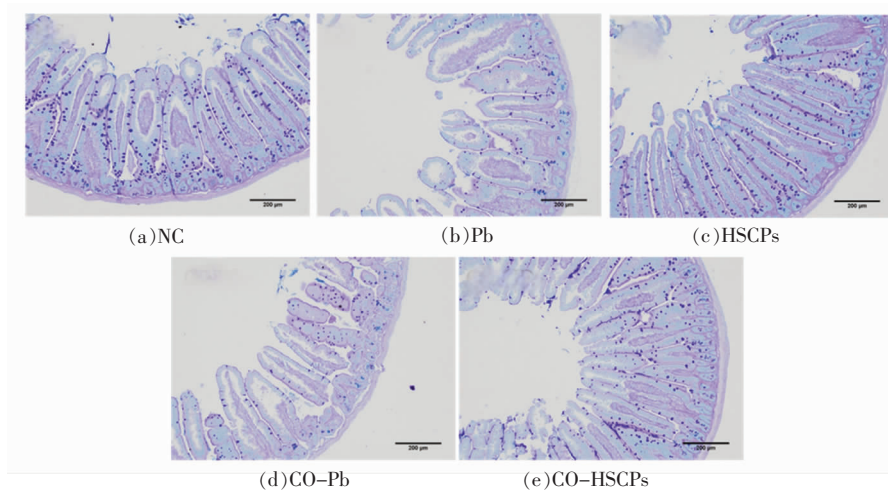


图 4 小鼠小肠组织杯状细胞的观察结果

Fig.4 Observation results of goblet cells in small intestine of mice

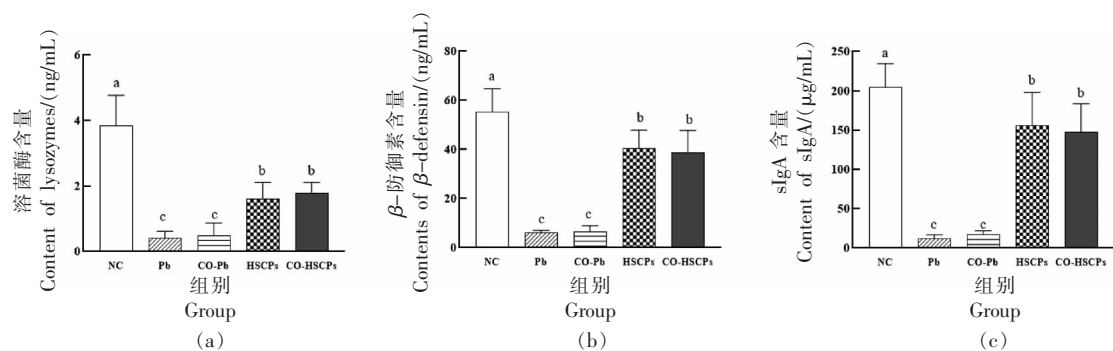


图 5 小鼠小肠中溶菌酶、β-防御素、sIgA 的含量

Fig.5 The contents of lysozymes, β-defensin and sIgA in the small intestine of mice

2、Occludin、Claudin-1、Lyz、Ang4 mRNA 表达量显著降低($P < 0.05$)。与 Pb 组比,CO-Pb 组 ZO-1、

ZO-2、Occludin、Claudin-1、Lyz、Ang4 mRNA 表达量差异不显著;HSCPs、CO-HSCPs 组 ZO-1、ZO-

2、Occludin、Claudin-1、Lyz、Ang4 mRNA 表达量显著升高($P<0.05$)。与 CO-Pb 组相比,CO-HSCPs

组中上述基因表达量均显著升高($P<0.05$)。

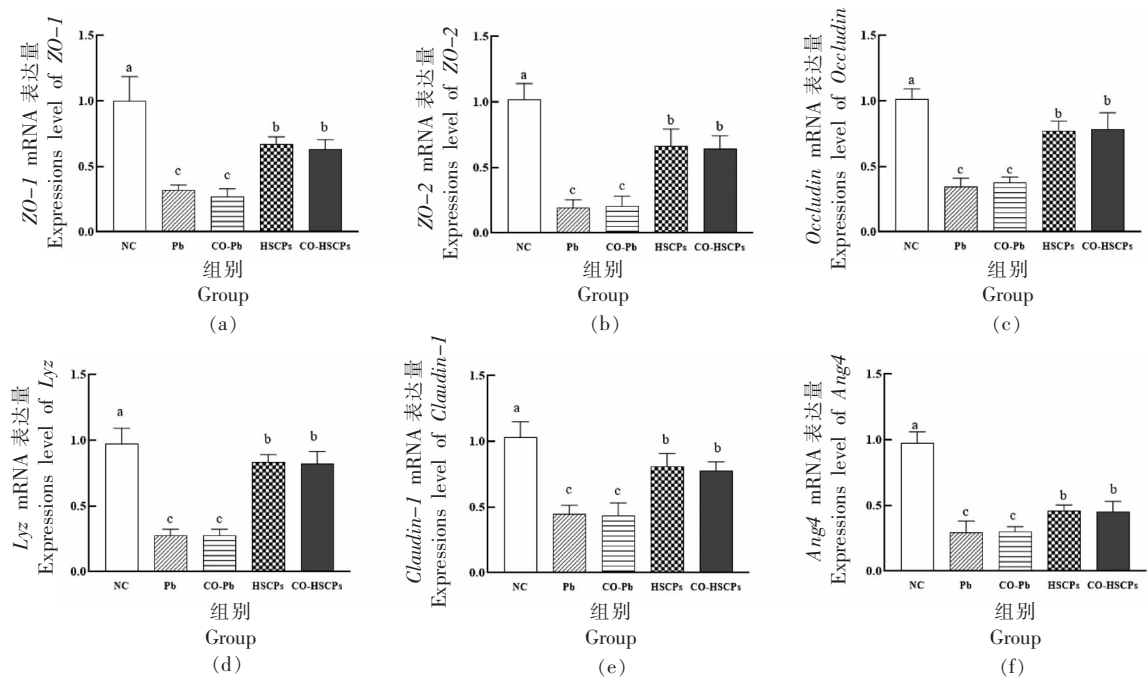


图 6 小鼠小肠中 ZO-1、ZO-2、Occludin、Claudin-1、Lyz、Ang4 mRNA 表达量

Fig.6 The mRNA expressions level of ZO-1, ZO-2, Occludin, Claudin-1, Lyz, Ang4 in the small intestine of mice

2.7 肠道菌群的测定

2.7.1 肠道菌群多样性 对样品中微生物的 16S rRNA 基因 V4 区域进行测序,探究各组小鼠肠道菌群之间的相关性,结果如图 7 所示。用 Chao1 和 ACE 指数估算样品中微生物的丰度;用 Shannon 指数估算样品中微生物多样性。与 NC 组相比,Pb 组 Chao1、ACE 和 Shannon 指数均显著下降 ($P<$

0.05)。与 Pb 组相比,CO-Pb 组 Chao1 和 ACE 指数均显著上升($P<0.05$),Shannon 指数升高,差异不显著;HSCPs、CO-HSCPs 组 Chao1、ACE 和 Shannon 指数均显著上升($P<0.05$)。与 CO-Pb 组相比,CO-HSCPs 组 Chao1、ACE 和 Shannon 指数均无显著差异。

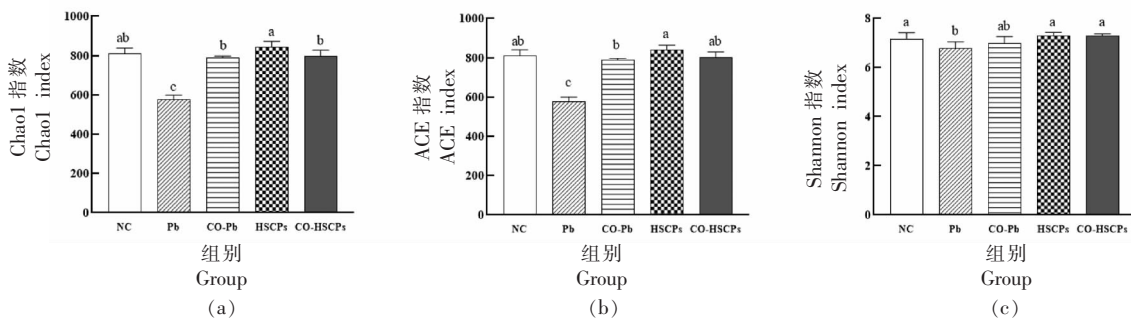


图 7 Chao1、ACE 指数及 Shannon 指数

Fig.7 Chao1 index, ACE index and Shannon index

2.7.2 肠道菌群门水平 如图 8 所示,每组中平均 84.55%以上都是由拟杆菌门 (Bacteroidetes)和

厚壁菌门(Firmicutes)组成,说明拟杆菌门和厚壁菌门为各组的优势菌门。

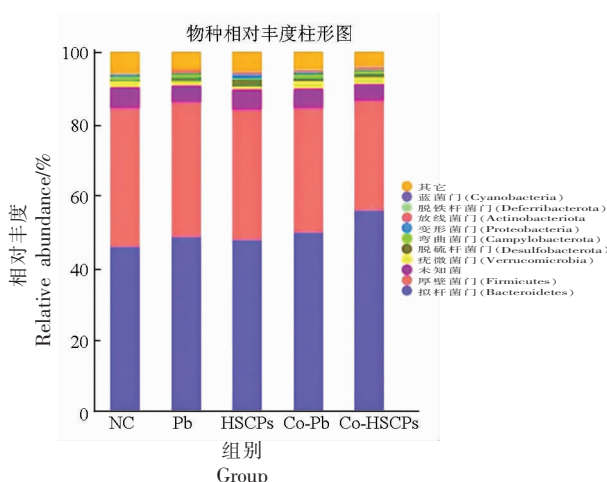


图 8 肠道菌群在门水平的测定结果
Fig.8 Determination results of gut microbiota at the phylum level

2.7.3 肠道菌群属水平 由图 9 可知, 在属水平下, 与 NC 组相比, Pb 组毛螺旋菌科_NK4A136_group

菌属 (*Lachnospiraceae_NK4A136_group*)、拟普雷沃氏菌属 (*Alloprevotella*)、粪杆菌属 (*Faecalibaculum*) 的相对丰度显著下降 ($P < 0.05$), 拟杆菌属 (*Bacteroides*) 的相对丰度虽呈下降趋势, 但差异不显著, 脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*) 的相对丰度显著升高 ($P < 0.05$); 与 Pb 组相比, CO-Pb 组粪杆菌属的相对丰度显著升高 ($P < 0.05$), 脱硫弧菌属的相对丰度均显著下降 ($P < 0.05$); HSCP 组毛螺旋菌科_NK4A136_group 菌属、粪杆菌属、拟普雷沃氏菌属的相对丰度显著升高 ($P < 0.05$), 脱硫弧菌属的相对丰度均显著下降 ($P < 0.05$); CO-HSCP 组拟普雷沃氏菌属的相对丰度显著升高 ($P < 0.05$), 脱硫弧菌属的相对丰度均显著下降 ($P < 0.05$)。CO-Pb 与 CO-HSCP 组相比, 上述菌群在门水平上无统计学差异。

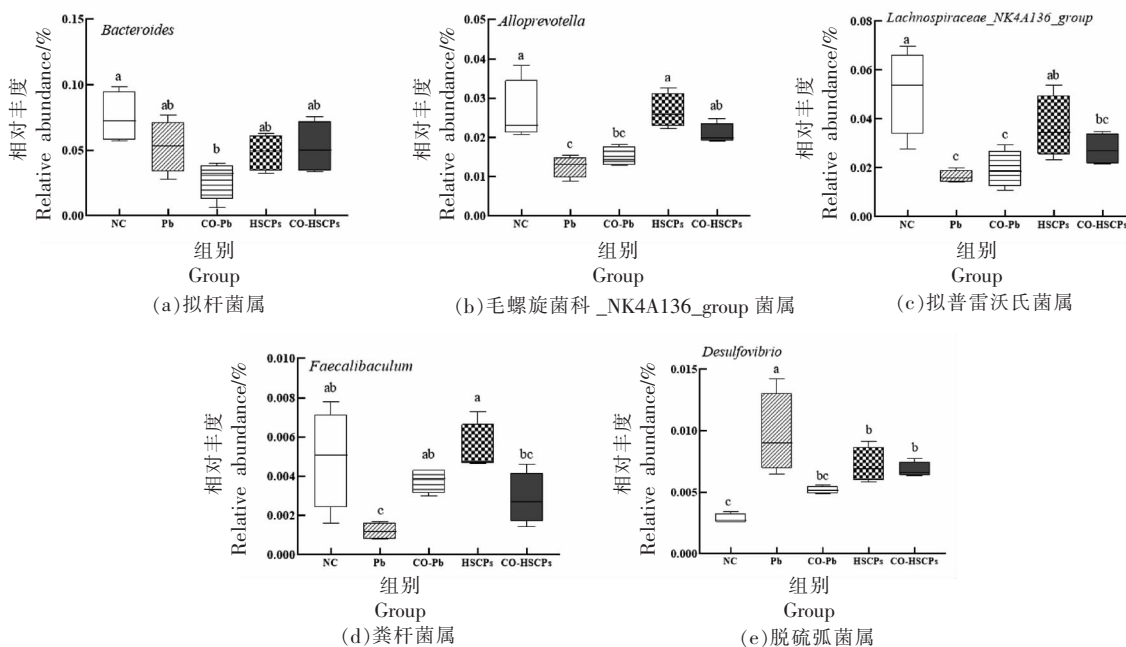
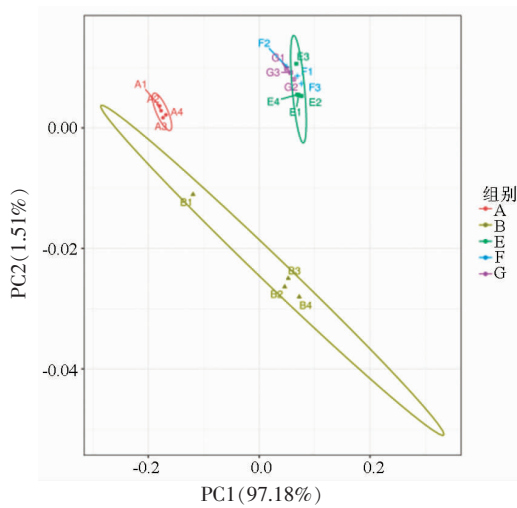


图 9 肠道菌群在门水平的测定结果
Fig.9 Determination results of gut microbiota at the genus level

2.8 代谢组学

2.8.1 主成分分析 采用高分辨率的超高效液相色谱串联质谱方法结合非靶向代谢组学分析了铅、HSCP 及同笼饲养对小鼠血清内源性代谢物的影响。主成分分析是一种无监督的模式识别方法, 用于分析整体代谢趋势, 发现并消除异常值,

从而提高模型的准确性, 本试验用于评估 NC、Pb、HSCP、CO-Pb 和 CO-HSCP 组之间的分离状况。如图 10 所示, NC 组与 Pb 组的代谢轮廓明显分开, 说明 NC 组与 Pb 组的代谢物质有明显差异, 染铅显著引起了小鼠血清代谢物质的变化; HSCP、CO-Pb 和 CO-HSCP 组与 Pb 组代谢轮廓



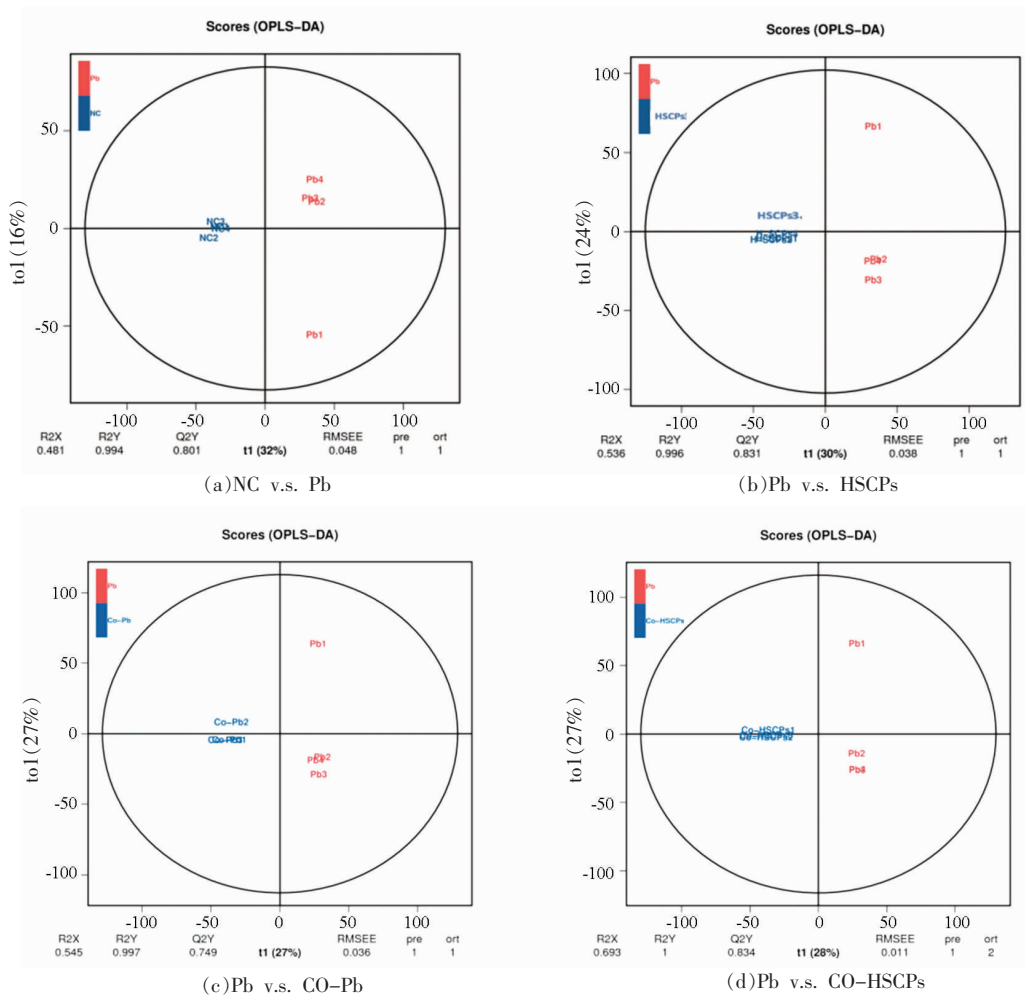
注:A. NC组;B. Pb组;E. HSCPs组;F. CO-Pb组;G. CO-HSCPs组。

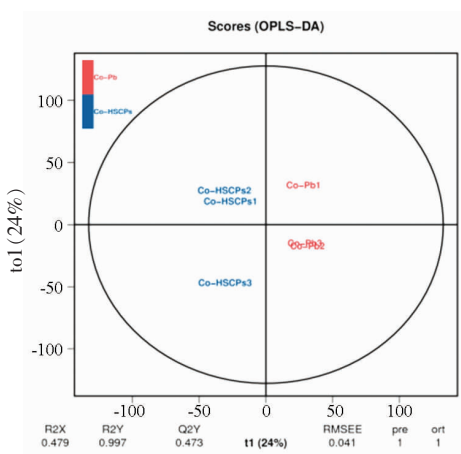
图 10 小鼠血清差异代谢物主成分分析图

Fig.10 Principal component analysis of differential metabolites in serum of mice

显著分开,代谢物质有明显差异;而 HSCPs、CO-Pb 和 CO-HSCPs 组之间代谢轮廓重合,代谢物质差异较小。

2.8.2 正交偏最小二乘法判别分析 为了确定各组之间差异的内源性代谢物,进行了 OPLS-DA 分析。OPLS-DA 是一种有监督的模式识别方法,用于区分群体间的差异,筛选出潜在的生物标志物。用 R^2X 、 R^2Y 和 Q^2 作为评价上述该方法建立的数学模型的指标,其中 R^2X 和 R^2Y 分别代表模型对 X 和 Y 矩阵的解释率, Q^2 代表模型的预测能力即所建模型能否通过代谢表达量区分正确的样本分组。理论上,当 R^2X 、 R^2Y 和 Q^2 的值较大,并且 R^2Y 和 Q^2 的值越接近于 1 时,数学模型更稳定可靠,即可以用此模型筛选差异代谢物。通常 $Q^2 > 0.5$ 时可认为是有效的模型, $Q^2 > 0.9$ 时为出色的模型。如图 11 所示,NC 组与 Pb 组相比,两组之间的样本





(e)CO-Pb v.s. CO-HSCPs

图 11 OPLS-DA 得分图

Fig.11 Diagram of OPLS-DA score

是明显分离的,并且 R^2Y 为 0.994、 Q^2 为 0.801,这表明模型是可靠的,与 NC 组相比,Pb 组的代谢发生了显著变化,表明染铅小鼠的代谢处于紊乱状态。CO-Pb、HSCPs 和 CO-HSCPs 组分别与 Pb 组相比,组间样本显著分离, R^2Y 分别为 0.997、0.996 和 1.000, Q^2 分别为 0.749、0.831 和 0.834,说明模型可靠稳定,HSCPs 干预后,小鼠代谢发生了明显的变化;CO-HSCPs 和 CO-Pb 组相比, R^2Y 为 0.997, Q^2 为 0.473<0.5,说明两组之间代谢差异较小。

2.8.3 组间差异代谢物分析 在本试验中,以 VIP 值>1 和 $P < 0.05$ (t 检验)为条件筛选显著改变的差异代谢物。如图 12 所示,与 NC 组相比,Pb

组有 1 075 个物质发生了变化,上调了 250 个,下调了 825 个,其中 684 个是其特有的代谢物质。与 Pb 组比,HSCPs 组有 762 个物质发生了变化,上调了 248 个,下调了 514 个,其中 241 个是其特有的代谢物质;CO-Pb 组有 612 个物质发生了变化,上调了 191 个,下调了 421 个,其中 93 个是其特有的代谢物质;CO-HSCPs 组有 573 个物质发生了变化,上调了 210 个,下调了 363 个,其中 93 个是其特有的代谢物质;与 CO-Pb 组相比,CO-HSCPs 组有 188 个物质发生了变化,上调了 138 个,下调了 50 个,其中 72 个是其特有的代谢物质。

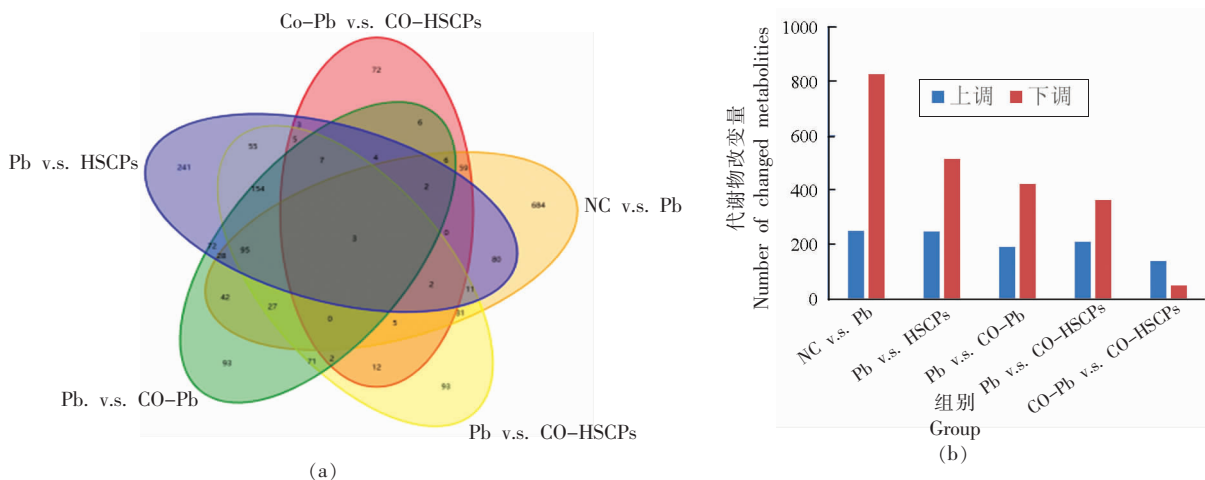


图 12 差异代谢物分析

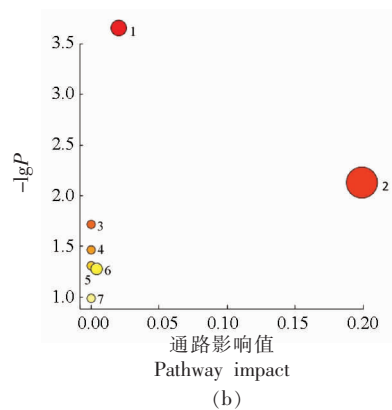
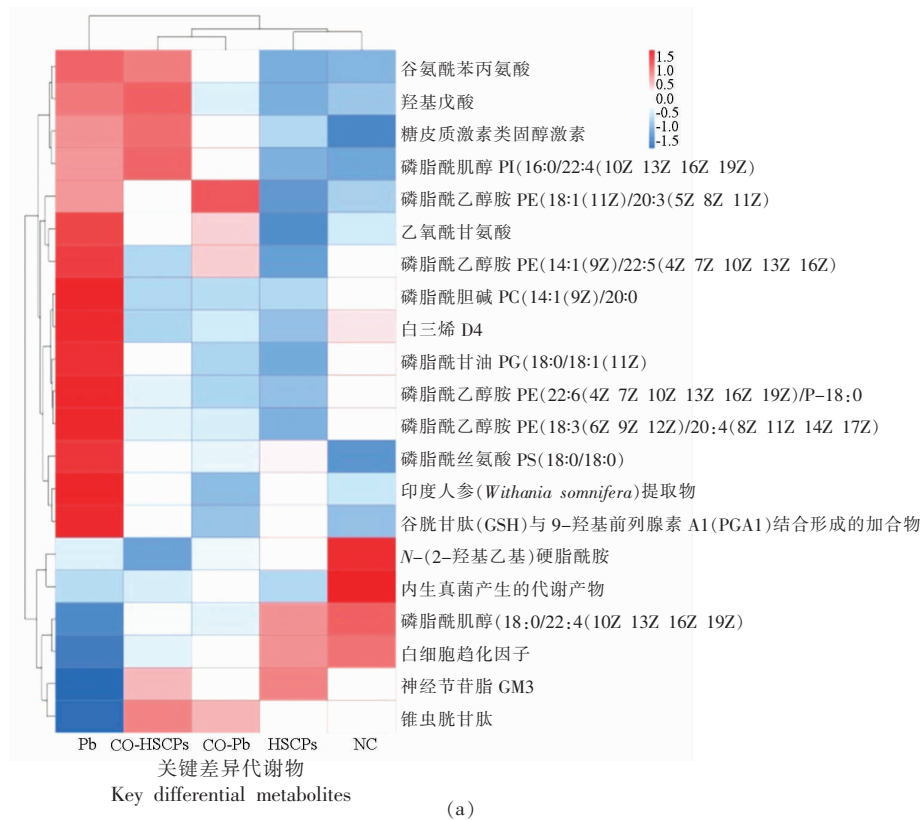
Fig.12 Analysis of differential metabolites

2.8.4 关键差异代谢物筛选及 KEGG 富集分析 基于上述差异代谢产物的结果,筛选出了 HSCPs 调

控的重要的差异代谢产物。通过对所有代谢物进行对比分析,筛选出 HSCPs 调控的差异代谢物共

24个,如图13所示。与空白对照组相比,Pb组上调了15个差异代谢物,下调了6个差异代谢物。HSCPs组有不同程度的回调,显示出了一定的调节作用。聚类热图中CO-Pb和CO-HSCPs组聚类在一起,说明这两组之间代谢差异物质较为相似,其中2组之间有14个差异物质的含量差异不显著,并且这14个物质对铅暴露显示出了一定的缓

解作用,故这14个物质为同笼混养主要影响的物质,将它们映射到KEGG数据库,进行注释分析,发现这些物质主要调控花生四烯酸代谢、甘油磷脂通路、亚油酸代谢、泛醌和其它萜类醌的生物合成、 α -亚麻酸代谢、糖基磷脂酰肌醇(GPI)-锚定生物合成和谷胱甘肽代谢途径。



注:b图中,1.花生四烯酸代谢,2.甘油磷脂通路,3.亚油酸代谢,4.泛醌和其它萜类醌的生物合成,5. α -亚麻酸代谢,6.糖基磷脂酰肌醇(GPI)-锚定生物合成,7.谷胱甘肽代谢。

图13 关键差异代谢物热图及KEGG富集通路分析

Fig.13 Heatmap of key differential metabolites and KEGG enrichment analysis

3 讨论

铅是有毒的重金属之一,由于其不可降解的特性,极易通过食物链沉积在人和动物体内^[24]。铅在机体内通常以铅盐与血浆蛋白结合的形式存在,而血液中的铅有 95% 左右分布在红细胞中^[25]。此外,肠道作为人及动物体内重要的吸收器官,铅蓄积会对肠道造成一定的危害^[26]。

小鼠血液、组织及粪便中铅含量是评价铅毒性的标准之一,同时能够反映机体的铅中毒程度。本研究发现,染铅会导致小鼠全血、小肠及粪便中铅含量的蓄积,说明染铅小鼠模型建立成功,而 HSCPs、CO-HSCPs 组血铅、小肠铅含量显著降低,粪便铅含量显著升高;CO-Pb 组血铅、小肠铅含量显著降低,可见 HSCPs 组小鼠单独或与 CO-Pb 组小鼠同笼饲养均可以促进小鼠对铅的排泄作用,减少小鼠全血和小肠中铅的累积,从而降低染铅小鼠机体铅水平。

本研究中,铅暴露首先引起小鼠红细胞数量和血红蛋白浓度显著下降,脂多糖含量显著升高。既往研究表明,铅能抑制血液系统的血红素合成酶,使二价铁离子不能和原卟啉结合,使血液中血红素合成受阻,进而导致血红蛋白浓度下降,还会增加红细胞脆性和膜通透性,从而造成贫血^[26-27]。铅还会抑制细胞酶的巯基,诱发产生氧自由基,使膜的抗氧化酶系统发生改变^[28]。此外,其还会导致红细胞中增加的游离原卟啉络合体中的锌离子形成锌卟啉,从而对造血系统产生危害^[29]。因此,本研究中铅暴露首先导致小鼠红细胞数量与血红蛋白浓度下降。在正常情况下,人及动物体内血清中脂多糖含量很低,当肠道屏障损伤或被破坏后,肠道通透性增加,会导致细菌和内毒素的移位进而引发肠道内的感染,脂多糖会从肠道泄露到血液中,甚至引发全身性的炎症反应^[30-32]。SLP 能显著逆转铅导致的血红蛋白浓度的下降及血清脂多糖的升高,说明 HSCPs 能够改善铅对血液系统的危害。同时,CO-Pb 组血清红细胞数量和血红蛋白浓度明显高于 Pb 组,表明 CO-HSCPs 小鼠与 CO-Pb 小鼠同笼饲养可减缓铅对血液系统的危害,提示同笼饲养可能通过某种方式交流改善铅对血液系统的危害。

本研究进一步利用 HE 染色和 AB-PAS 观察

小鼠小肠的组织显微结构及杯状细胞的数量。研究表明,染铅导致小鼠小肠绒毛变短、断裂、脱落以及排列杂乱,提示小鼠肠道机械屏障被严重破坏,而 HSCPs 和 CO-HSCPs 组有效缓解了铅对小肠绒毛结构的破坏及杯状细胞数量的减少,对肠道屏障具有修复作用。CO-Pb 组与 Pb 组小肠绒毛结构及杯状细胞数量结果相似,可能与混养周期有关。此外,紧密连接是重要的防御屏障之一,在肠黏膜屏障中起重要作用^[33]。紧密连接是整体膜蛋白 (Claudins 和 Occludin) 和细胞质支架蛋白 (ZO-1、ZO-2 和 ZO-3) 的多蛋白复合物,通过控制含有内皮细胞和上皮细胞黏膜的通透性来提供屏障功能。溶菌酶和防御素是由小肠潘氏细胞分泌的天然抗菌肽物质,能够杀灭肠道内有害细菌从而起到保护肠道的的作用^[34]。sIgA 是肠道黏膜表面重要的免疫球蛋白,是抵御肠道病原菌的第一道防线,能够阻抑细菌、病毒等病原体的黏附,使之不能在黏膜表面定植并繁殖,从而防止感染的发生,是肠道免疫屏障的主要效应因子^[35-36]。本研究发现,铅能够显著降低小肠溶菌酶、 β -防御素和 sIgA 的含量及 ZO-1、ZO-2、Occludin 和 Claudin-1 的 mRNA 的表达量,说明铅对小鼠肠道造成了损伤,破坏了小鼠肠道屏障功能。HSCPs 和 CO-HSCPs 均可以逆转这种趋势,缓解铅对肠道的损伤,增强肠道屏障功能。CO-Pb 组与 Pb 组相比,小肠溶菌酶、 β -防御素和 sIgA 的含量及 ZO-1、ZO-2、Occludin 和 Claudin-1 的 mRNA 的表达量差异不显著,可能与其混养周期有关。

为了探究 CO-HSCPs 与 CO-Pb 小鼠同笼饲养是否可以通过肠道菌群交流而影响染铅小鼠的肠道屏障损伤,对肠道菌群进行研究。本研究中,铅引起小鼠肠道菌群丰度和多样性的下降,而 HSCPs、CO-HSCPs 组 Chao1、ACE 和 Shannon 指数均显著上升,提升了肠道菌群的丰度和多样性;CO-Pb 组 Chao1 和 ACE 指数均显著上升,Shannon 指数略升高,说明 CO-HSCPs 与 CO-Pb 小鼠同笼饲养可增加 CO-Pb 小鼠肠道菌群的丰度。在门水平上,小鼠肠道优势菌群为拟杆菌门和厚壁菌门。在属水平上,铅导致毛螺旋菌科_NK4A136_group 菌属、拟普雷沃氏菌属、粪杆菌属的相对丰度显著下降,脱硫弧菌属的相对丰度显著上升。毛螺旋菌

科被认为是一种潜在的有益细菌,与肠道炎症呈负相关关系。拟普雷沃氏菌属是短链脂肪酸产生菌,在缓解炎症方面发挥积极作用。粪杆菌属是厚壁菌门的主要成员,是人类肠道中的一种常见细菌,也是丁酸的主要产生菌之一,丁酸为肠道提供能量,并起到抗炎作用。脱硫弧菌属相对丰度的增加被认为是溃疡性结肠炎的一个重要特征。与 Pb 组相比,HSCPs 处理或 CO-HSCPs 与 CO-Pb 同笼饲养可显著增加粪杆菌属或拟普雷沃氏菌属的相对丰度,显著降低脱硫弧菌属的相对丰度均显著下降,而 CO-HSCPs 与 CO-Pb 相比,上述菌群在门水平上无统计学差异,说明 HSCPs 能够通过上调小鼠有益菌菌群和下调有害菌菌群来缓解铅导致的小鼠肠道屏障损伤;同笼饲养能够通过小鼠之间微生物群的水平传播,将 CO-HSCPs 小鼠的菌群转染给 CO-Pb 小鼠,从而调节染铅小鼠肠道屏障损伤,与之前研究结果一致^[1]。

本试验基于非靶代谢组学,对各组小鼠血清进行内源性代谢物质分析。以 VIP 值>1 和 $P<0.05$ 为条件筛选差异代谢物,应用各组的趋势交集进一步筛选出 HSCPs 调控的 24 个潜在的代谢标志物。与 NC 组相比,Pb 组上调了 15 个差异代谢物质,下调了 6 个差异代谢物质,HSCPs、CO-Pb 及 CO-HSCPs 组均有不同程度的回调现象。CO-Pb 和 CO-HSCPs 这两组之间差异代谢物质较为相似,其中有 14 个差异物质的含量差异不显著,并且这 14 个物质对铅暴露显示出了一定的缓解作用,说明这 14 个物质为同笼饲养主要影响的物质,将它们映射到 KEGG 数据库,进行注释分析,发现这些物质主要调控花生四烯酸代谢、甘油磷脂通路、亚油酸代谢、泛醌和其它萜类醌的生物合成、 α -亚麻酸代谢、糖基磷脂酰肌醇(GPI)-锚定生物合成和谷胱甘肽代谢途径,以上结果说明同笼饲养可能通过以上代谢通路改善铅所导致的肠道屏障损伤。

综上,同笼饲养可通过将 CO-HSCPs 组小鼠的菌群转染给 CO-Pb 组小鼠,调节肠道菌群和花生四烯酸代谢、甘油磷脂通路、亚油酸代谢、泛醌和其它萜类醌的生物合成、 α -亚麻酸代谢、糖基磷脂酰肌醇(GPI)-锚定生物合成和谷胱甘肽代谢途径等代谢通路,从而减轻铅对肠道屏障的损伤,促

进肠道健康。

4 结论与展望

同笼饲养可通过将 CO-HSCPs 组小鼠的菌群转染给 CO-Pb 组小鼠,增加 CO-Pb 组小鼠有益菌的相对丰度,影响甘油磷脂通路、花生四烯酸代谢、亚油酸代谢等 7 个代谢途径,改善铅所导致的小鼠肠道屏障损伤。虽然上述研究是在小鼠模型中进行的,但铅中毒的机制在不同物种间具有一定的相似性,绣球菌多糖的排铅效果可能在其它动物模型中也有所体现。然而,需要更多的研究来验证这些效果在其它动物模型和人类中的适用性。实际应用中尚存在潜在限制,如:剂量和个体差异:不同个体对绣球菌多糖的反应可能存在差异,需要确定适宜的剂量和使用频率;长期效应和安全性:长期摄入绣球菌多糖的安全性和潜在副作用需要进一步研究;实际饮食中的可行性:在实际饮食中,绣球菌多糖的摄入量和稳定性可能受到限制,需要研究如何在饮食中有效整合这些成分。综上所述,绣球菌多糖在小鼠模型中显示出促进排铅和改善血液及小肠状况的潜力,但其在其他动物模型或人类中的适用性以及实际应用的可行性和限制需要进一步的研究和评估。

参 考 文 献

- [1] CARUSO R, ONO M, BUNKER M E. Dynamic and asymmetric changes of the microbial communities after cohousing in laboratory mice[J]. Cell Reports, 2019, 27(785): 3401-3412.
- [2] TOMASZEWSKA E, WINIARSKA -MIECZAN A, DOBROWOLSKI P. The lack of protective effects of tea supplementation on liver and jejunal epithelium in adult rats exposed to cadmium and lead[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2015, 40(3): 708-714.
- [3] 姚爽. 硒对铅引起鸡肠道毒性的缓解作用[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2016.
YAO S. The alleviating effect of selenium on lead induced intestinal toxicity in chickens[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2016.
- [4] 马申嫣, 王晶, 朱家民, 等. 植物蛋白-益生菌复合制剂对小鼠铅毒性的缓解作用[J]. 食品与发酵工业,

- 2021, 47(13): 51–58.
- MA S Y, WANG J, ZHU J M, et al. Alleviating effects of plant protein–probiotics preparation on lead toxicity in mice[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(13): 51–58.
- [5] GAO B, CHI L, MAHBUB R, et al. Multi–omics reveals that lead exposure disturbs gut microbiome development key metabolites and metabolic pathways [J]. Chemical Research in Toxicology, 2017, 30(4): 996–1005.
- [6] 屈定武, 翟齐啸, 于雷雷, 等. 多形拟杆菌对小鼠急性铅毒性的缓解作用[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(16): 54–62.
- QU D W, ZHAI Q X, YU L L, et al. *Bacteroides thetaiotaomicron* alleviated the acute lead toxicity in mouse [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(16): 54–62.
- [7] 王晶, 翟齐啸, 赵建新, 等. 双孢蘑菇粉复配益生菌的生态制剂缓解铅暴露小鼠的效果评价[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(12): 20–27.
- WANG J, ZHAI Q X, ZHAO J X, et al. Alleviating effect of a microecological preparation consisted of probiotics and *Agaricus bisporus* powder on lead poisoning using lead–exposed mice[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(12): 20–27.
- [8] 刘昭曦, 王禄山, 陈敏. 肠道菌群多糖利用及代谢 [J]. 微生物学报, 2020, 61(7): 1816–1828.
- LIU Z X, WANG L S, CHEN M. Utilization and metabolism of polysaccharides in gut microbiota [J]. Journal of Microbiology, 2020, 61(7): 1816–1828.
- [9] ZHAN Y F, AN X N, WANG S, et al. Basil polysaccharides; A review on extraction, bioactivities and pharmacological applications [J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2020, 28(1): 115179.
- [10] 赵翠莉, 马吉飞, 宋春青, 等. 姬松茸多糖对铅中毒小鼠的促排铅作用研究[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(30): 12032–12033.
- ZHAO C L, MA J F, SONG C Q, et al. The research on the function of expelling lead of *Agaricus blazei* Murill polysaccharide [J]. Journal of Anhui Agri, 2013, 41(30): 12032–12033.
- [11] 胡明月, 梁艳, 郑姗姗, 等. 海藻多糖的促排铅药效初步研究[J]. 中国处方药, 2020, 18(1): 32–33.
- HU M Y, LIANG Y, ZHENG S S, et al. Preliminary study on the effect of seaweed polysaccharides on promoting lead excretion [J]. Chinese Prescription Drugs, 2020, 18(1): 32–33.
- [12] 宁红梅, 葛亚明, 雒海潮, 等. 枸杞多糖促排铅功效初步研究[J]. 郑州轻工业学院学报(自然科学版), 2011, 26(2): 15–17.
- NING H H, GE Y M, LUO H C, et al. Study on the role of *Lycium barbarum* polysaccharides for eliminating lead–exposed mice [J]. Journal of Zhengzhou University of Light Industry (Natural Science), 2011, 26(2): 15–17.
- [13] 王进, 张岩, 赵德雪, 等. 岩藻多糖排铅作用研究 [J]. 泰山医学院学报, 2011, 32(2): 81–83.
- WANG J, ZHANG Y, ZHAO D X, et al. Research on the lead removal effect of fucoid polysaccharides [J]. Journal of Mount Taishan Medical College, 2011, 32(2): 81–83.
- [14] 邱霞, 张健, 李可昌, 等. 肠道菌群与植物多糖相关性研究进展[J]. 中国食物与营养, 2021, 27(1): 54–57.
- QIU X, ZHANG J, LI K C, et al. Research progress on the correlation between gut microbiota and plant polysaccharides [J]. Chinese Food and Nutrition, 2021, 27(1): 54–57.
- [15] HAN J M, LEE E K, GONG S Y, et al. *Sparassis crispa* exerts anti–inflammatory activity via suppression of TLR–mediated NF– κ B and MAPK signaling pathways in LPS–induced RAW264.7 macrophage cells [J]. Journal of Ethnopharmacol, 2019, 231: 10–18.
- [16] HAO Z Q, CHEN Z J, CHANG M C, et al. Rheological properties and gel characteristics of polysaccharides from fruit–bodies of *Sparassis crispa* [J]. International Journal of Food Properties, 2018, 21: 2283–2295.
- [17] 郝正祺. 绣球菌多糖结构鉴定、凝胶流变学特性及其抗氧化和免疫功能研究[D]. 太原: 山西农业大学, 2018.
- HAO Z Q. Structural identification, rheological and gel characteristics, antioxidant and immunity activities of *Sparassis crispa* polysaccharides [D]. Taiyuan: Shanxi Agricultural University, 2018.
- [18] 郝晨阳, 程艳芬, 徐丽婧, 等. 广叶绣球菌多糖对免疫低下小鼠肠道免疫功能的调节作用[J]. 菌物学报, 2020, 39(7): 1380–1390.
- HAO C Y, CHENG Y F, XU L J, et al. Regulatory effects of *Sparassis latifolia* polysaccharide on intestinal immune function in immunosuppressed

- mice[J]. *Mycosystema*, 2020, 39(7): 1380-1390.
- [19] 王萌皓, 郝正祺, 常明昌, 等. 绣球菌 β -D-葡聚糖对巨噬细胞 RAW264.7 免疫调节作用受体 TLR4 和 TLR2 的影响[J]. 菌物学报, 2020, 39(5): 907-916. WANG M H, HAO Z Q, CHANG M C, et al. Regulatory effects of *Sparassis latifolia* polysaccharide on intestinal immune function in immunosuppressed mice[J]. *Mycosystema*, 2020, 39(5): 907-916.
- [20] 高渊, 杨亚茹, 常明昌, 等. 基于代谢组学研究绣球菌多糖对高脂血症大鼠的降血脂作用[J]. 食品科学, 2021, 42(11): 168-175. GAO Y, YANG Y R, CHANG M C, et al. Metabonomic study on hypolipidemic effect of *Sparassis crispa* polysaccharides on hyperlipidemic rats[J]. *Food Science*, 2021, 42(11): 168-175.
- [21] SONG W R, YAN J, WU F, et al. A study on antitumor effect of ultramicro powder of *Sparassis latifolia*[J]. *Mycosystema*, 2017, 36(12): 1651-1658.
- [22] CHOI M H, HAN H K, LEE Y J, et al. *In vitro* anti-cancer activity of hydrophobic fractions of *Sparassis latifolia* extract using AGS, A529, and HepG2 cell lines[J]. *Journal of Mushroom*, 2014, 12: 304-310.
- [23] 杨亚茹, 郝正祺, 常明昌, 等. 绣球菌酸性多糖的分离纯化、结构鉴定及抗氧化活性研究[J]. 食用菌学报, 2019, 26(3): 105-112. YANG Y R, HAO Z Q, CHANG M C, et al. Isolation, purification, structural identification and antioxidant activity of acidic polysaccharide in *Sparassis crispa*[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2019, 26(3): 105-112.
- [24] XING S C, HUANG C B, MI J D, et al. *Bacillus coagulans* R11 maintained intestinal villus health and decreased intestinal injury in lead-exposed mice by regulating the intestinal microbiota and influenced the function of faecal microRNAs[J]. *Environmental Pollution*, 2019, 255: 113139.
- [25] 樊宁, 刘凤兰, 蒋培荣. 铅作业工人血铅、尿铅和血常规检测结果分析[J]. 职业与健康, 2011, 27(9): 982-983. FAN N, LIU F L, JIANG P R. Blood lead, urine lead, and blood routine results for lead workers[J]. *Occup and Health*, 2011, 27(9): 982-983.
- [26] WHITE J M, SELHI H S. Lead and the red cell[J]. *British Journal of Haematology*, 1975, 30: 133.
- [27] 李建伟, 刘芬, 王忻玥, 等. 学龄前儿童外周血重金属含量及其与铁代谢和红细胞参数的相关性[J]. 广西医学, 2020, 42(2): 138-140, 163. LI J W, LIU F, WANG X Y, et al. The content of heavy metals in peripheral blood of preschool children and its correlation with iron metabolism and red blood cell parameters[J]. *Guangxi Medical Journal*, 2020, 42(2): 138-140, 163.
- [28] 张陆, 张秀英, 李金龙, 等. 铅镉联合对雏鸡红细胞形态及渗透脆性的影响[J]. 东北农业大学学报, 2011, 42(12): 65-68. ZHANG L, ZHANG X Y, LI J L, et al. Effects of combination of lead and cadmium on morphology and osmotic fragility of chicken erythrocytes[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2011, 42(12): 65-68.
- [29] 陈榕, 王谦可, 梁意引, 等. 职业接触铅人群血铅及锌原卟啉、血常规指标的变化[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(11): 1625-1630. CHEN R, WANG Q K, LIANG Y Y, et al. Changes of blood lead, blood zinc porphyrin, blood routine index in lead-exposed population[J]. *Chin J Health Lab Tec*, 2014, 24(11): 1625-1630.
- [30] 屈定武, 翟齐啸, 于雷雷, 等. 多形拟杆菌对小鼠急性铅毒性的缓解作用[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(16): 54-62. QU D W, ZHAI Q X, YU L L, et al. *Bacteroides thetaiotaomicron* alleviated the acute lead toxicity in mouse[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(16): 54-62.
- [31] 周一晨, 郭贺楠, 张静, 等. 后生素对肠道屏障的影响[J]. 饲料工业, 2023(2): 14-20. ZHOU Y C, GUO H N, ZHANG J, et al. The effect of epigenetics on intestinal barrier[J]. *Feed Industry*, 2023(2): 14-20.
- [32] 王晶, 翟齐啸, 赵建新, 等. 双孢蘑菇粉复配益生菌的生态制剂缓解铅暴露小鼠的效果评价[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(12): 20-27. WANG J, ZHAI Q X, ZHAO J X, et al. Alleviating effect of a microecological preparation consisted of probiotics and *Agaricus bisporus* powder on lead poisoning using lead-exposed mice[J]. *Food and Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(12): 20-27.
- [33] RUAN Z, LIU S, ZHOU Y, et al. Chlorogenic acid decreases intestinal permeability and increases ex-

- pression of intestinal tight junction proteins in weaned rats challenged with LPS [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e97815.
- [34] 曹露. 鱿鱼墨多糖对环磷酰胺所致小鼠肠道黏膜上皮细胞损伤的保护作用研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
- CAO L. Study on the protective effect of squid ink polysaccharide on cyclophosphamide induced intestinal mucosal epithelial cell damage in mice [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013.
- [35] 劳澄婕. 长期灌胃柠檬酸铁对小鼠空肠黏膜免疫屏障和机械屏障的影响[D]. 雅安: 四川农业大学, 2019.
- LAO C J. Effects of long-term gavage of iron citrate on the mucosal and mechanical barriers of the small intestine in mice [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2019.
- [36] 王静. 小建中汤对脾虚泄泻幼鼠肠道菌群及肠粘膜免疫功能影响的研究[D]. 泸州: 西南医科大学, 2020.
- WANG J. Research on the effects of Xiaojianzhong Decoction on intestinal flora and intestinal mucosal immune function in infant rats with spleen deficiency diarrhea [D]. Luzhou: Southwest Medical University, 2020.

Alleviating Effects of *Sparassis latifolia* Polysaccharides on Intestinal Barrier Damage in Lead-exposed Mice

Feng Yan¹, Liang Guodong², Qiao Yaoyao², Li Jiaxin², Qiao Zening², Yun Shaojun^{2,3}, Cheng Feier^{2,3},
Cheng Yanfen^{2,3}, Cao Jinling^{2,3}, Feng Cuiping^{2*}

¹Department of Biology and Food Engineering, Lvliang University, Lvliang 033000, Shanxi

²College of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi

³Shanxi Key Laboratory of Edible Fungi for Loess Plateau, Taigu 030801, Shanxi

Abstract Objective: The study aimed to investigate the alleviating effect and mechanism of *Sparassis latifolia* polysaccharides (HSCPs) on intestinal barrier damage in lead-exposed mice under cohousing conditions. Methods: Sixty Kunming mice were randomly divided into blank control group (NC), Pb group (Pb), HSCPs group, co-housing group between Pb group and HSCPs group (CO Pb+CO HSCPs). After 8 weeks of feeding, the concentrations of red blood cells and hemoglobin were measured by an automatic blood cell analyzer. ICP-MS was used to determine the Pb content in the blood, small intestine, and feces of mice. The content of lipopolysaccharides in serum, and levels of small intestine lysozyme, β -defensin and sIgA were detected by ELISA kit. HE staining and AP-PAS was used to observe the microstructure and the number of goblet cells in the small intestine. qPCR was used to measure the mRNA expression levels of *ZO-1*, *ZO-2*, *Occludin*, *Claudin-1*, *Lyz*, and *Ang4* in the small intestine; intestinal flora was analyzed by 16S rRNA amplicon sequencing. Endogenous metabolites in serum were explored by metabolomics analysis. Results: Compared with the NC group, the Pb group showed a significant increase in levels of blood Pb, small intestine Pb, fecal Pb and serum lipopolysaccharide, and relative abundance of *Desulfovibrio* ($P < 0.05$). The number of red blood cells, hemoglobin concentration, levels of lysozyme, β -defensin and sIgA, mRNA levels of *ZO-1*, *ZO-2*, *Occludin*, *Claudin-1*, *Lyz* and *Ang4*, and the relative abundance of *Lachnospiraceae_NK4A136_group*, *Alloprevotella* and *Faecalibaculum* significantly decreased ($P < 0.05$). The villi of the small intestine became shorter, broken and partly falling, the space between villi increased, and the goblet cells decreased significantly. Compared with the Pb group, the levels of blood Pb, small intestinal Pb, and the relative abundance of *Desulfovibrio* significantly decreased ($P < 0.05$), while the numbers of red blood cells, hemoglobin concentration and the relative abundance of *Faecalibaculum* increased significantly in the CO-Pb group ($P < 0.05$). In addition, the levels of lysozyme, β -defensin and sIgA, and mRNA expression levels of *ZO-1*, *ZO-2*, *Occludin*, *Claudin-1*, *Lyz*, and *Ang4* were not significantly affected. The villi of the small intestine were short and broken, goblet cell were less. The contents of serum lipopolysaccharides, blood Pb, and small intestinal lead, and the relative abundance of *Desulfovibrio* in the HSCPs and CO-HSCPs groups significantly decreased ($P < 0.05$), while

hemoglobin concentration, fecal Pb content, levels of lysozyme, β -defensin, and sIgA content, the expression levels of *ZO-1*, *ZO-2*, *Occludin*, *Claudin-1*, *Lyz*, and *Ang4*, and the relative abundance of *Alloprevotella* increased significantly ($P < 0.05$). There were 14 different metabolites in the co-housing mice involved in seven metabolic pathways including glycerol phospholipid pathway, arachidonic acid pathway and linoleic acid pathway. Conclusion: Co-housing could improve the damage of intestinal barrier in Pb-induced mice by transfecting the intestinal flora in the CO-HSCPs mice to the CO-Pb mice, thus increasing the relative abundance of beneficial bacteria in the CO-Pb group and affecting seven metabolic pathways, including glycerol phospholipid pathway, arachidonic acid pathway, linoleic acid pathway, and so on.

Keywords co-housing; *Sparassis latifolia* polysaccharides; Pb; intestinal flora; metabolomics