

复合益生菌改善小鼠抗生素相关性腹泻的作用

陆丽仪, 高业成, 陈君龙, 郭亚娟, 刘华林, 陈 昌, 毛新亮

Effect of Probiotics Complex on Improving Antibiotic-associated Diarrhea in Mice

LU Liyi, GAO Yecheng, CHEN Junlong, GUO Yajuan, LIU Hualin, CHEN Chang, and MAO Xinliang

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024050212>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

西洋参多糖对克林霉素磷酸酯诱导的抗生素相关性腹泻的改善作用

Ameliorative Effect of *Panax quinquefolius* Polysaccharides on Antibiotic-associated Diarrhea Induced by Clindamycin Phosphate

食品工业科技. 2021, 42(12): 354-361 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020090144>

肠道微生物及其代谢产物对血脑屏障的影响及益生菌干预措施研究进展

Research Progress in Effects of Gut Microbiota and Their Metabolites on the Blood-brain Barrier and Interventions by Probiotics

食品工业科技. 2024, 45(22): 353-360 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023120146>

鼠李糖乳杆菌MP108缓解细菌性腹泻的作用研究

Study of *Lactocaseibacillus rhamnosus* MP108 on Alleviating Bacterial Diarrhea

食品工业科技. 2022, 43(21): 20-27 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022030306>

肠道菌群代谢产物短链脂肪酸与抑郁症关系的研究进展

Research Progress on the Relationship between Short-chain Fatty Acids Metabolized by Intestinal Flora and Depression

食品工业科技. 2022, 43(7): 424-429 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021030387>

益生菌对2型糖尿病小鼠的调节作用

Administration of Probiotics on Type 2 Diabetes Mice

食品工业科技. 2020, 41(19): 339-346 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.19.053>

益生菌复合制剂对头孢曲松钠作用小鼠的抗氧化指标、细胞因子及肠道菌群的影响

Effects of Probiotic Compound Preparations on Antioxidant Indexes, Cytokines and Intestinal Flora in Mice Treated with Ceftriaxone Sodium

食品工业科技. 2022, 43(15): 383-391 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021110359>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

陆丽仪, 高业成, 陈君龙, 等. 复合益生菌改善小鼠抗生素相关性腹泻的作用 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(9): 363–371. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024050212

LU Liyi, GAO Yecheng, CHEN Junlong, et al. Effect of Probiotics Complex on Improving Antibiotic-associated Diarrhea in Mice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(9): 363–371. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024050212

· 营养与保健 ·

复合益生菌改善小鼠抗生素相关性腹泻的作用

陆丽仪¹, 高业成^{2,3,*}, 陈君龙¹, 郭亚娟¹, 刘华林¹, 陈 昌¹, 毛新亮^{1,3,*}

(1.完美(广东)日用品有限公司, 广东中山 528400;

2.内蒙古农业大学, 内蒙古呼和浩特 010018;

3.广东完美生命健康科技研究院有限公司, 广东中山 528400)

摘要: 益生菌常用于临床上改善抗生素相关性腹泻 (Antibiotic-associated diarrhoea, AAD), 本研究旨在分析复合益生菌对 AAD 的改善效果并探究其作用机制。使用三联抗生素混合溶液建立 AAD 小鼠模型, 观察复合益生菌对小鼠粪便状态及结肠组织结构的影响, 分析肠道屏障功能相关基因表达水平、粪便短链脂肪酸及肠道菌群群落结构的变化。结果表明, 复合益生菌可显著降低小鼠粪便含水量和粪便稠度评分 ($P<0.05$), 显著增加乙酸、丁酸含量 ($P<0.05$), 显著上调肠道紧密连接蛋白 ZO-1、occludin 的 mRNA 表达水平 ($P<0.05$)。同时, 可通过增加以毛螺菌科 (Lachnospiraceae) 为代表的有益菌增殖和减少以铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 为代表的条件致病菌的富集, 在一定程度上改善抗生素引起的肠道菌群失衡。以上结果表明, 复合益生菌具有通过调节肠道菌群及其微环境、增强肠道屏障及提高短链脂肪酸含量, 进而缓解 AAD 症状的潜力。

关键词: 抗生素相关性腹泻, 益生菌, 肠道菌群, 短链脂肪酸, 紧密连接蛋白

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2025)09-0363-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024050212



本文网刊:

Effect of Probiotics Complex on Improving Antibiotic-associated Diarrhea in Mice

LU Liyi¹, GAO Yecheng^{2,3,*}, CHEN Junlong¹, GUO Yajuan¹,

LIU Hualin¹, CHEN Chang¹, MAO Xinliang^{1,3,*}

(1.Perfect (Guangdong) Commodity Co., Ltd., Zhongshan 528400, China;

2.Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;

3.Guangdong Perfect Life Health Science and Technology Research Institute Co., Ltd., Zhongshan 528400, China)

Abstract: Probiotics are frequently utilized in clinical practice to mitigate antibiotic-associated diarrhoea (AAD). This study aimed to assess the efficacy of probiotics complex in ameliorating AAD and to elucidate the underlying mechanisms. AAD was induced in mice using a mixture of three antibiotics. The impact of the probiotics complex on fecal properties and colonic tissue structure were evaluated, alongside the expression levels of genes related to intestinal barrier function, short-chain fatty acids, and the structure of the intestinal microbiota community. The results indicated that probiotics complex significantly reduced fecal water content and consistency score in mice ($P<0.05$) and significantly increased the levels of acetic acid and butyric acid ($P<0.05$). Furthermore, the administration of probiotics complex notably up-regulated the mRNA expression levels of intestinal tight junction proteins ZO-1 and occludin ($P<0.05$). Moreover, probiotics complex

收稿日期: 2024-05-17 +并列第一作者

作者简介: 陆丽仪 (1997-), 女, 硕士, 研究方向: 功能食品在动物模型上功效评价及作用机理, E-mail: 760171623@qq.com。

高业成 (1985-), 男, 博士研究生, 研究方向: 食品安全与功能评价, E-mail: gaoyc@perfect99.com。

* 通信作者: 毛新亮 (1982-), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 功能食品, E-mail: yfzx02@perfect99.com。

partially mitigated antibiotic-induced dysbiosis by promoting beneficial bacteria proliferation such as Lachnospiraceae, and reducing conditionally pathogenic species such as *Pseudomonas aeruginosa*. These results suggest that probiotics complex has the potential to alleviate AAD symptoms, through modulating the gut microbiota and their niche, strengthening the intestinal barrier, and increasing short-chain fatty acid levels.

Key words: antibiotic-associated diarrhea; probiotics; gut microbiota; short-chain fatty acids; tight junction protein

抗生素是临床上治疗细菌感染有效且常见的药物,广谱抗生素普遍对绝大部分微生物都具有抑制作用。而抗生素相关性腹泻(Antibiotic-associated diarrhoea, AAD)是抗生素治疗中的常见不良反应之一,其发病率逐年上升,约 5%~35% 的患者在抗生素治疗期间或结束时出现 AAD^[1],尤其在老年人和儿童中更为普遍^[2]。AAD 的发病机制各不相同,抗生素可直接损伤肠黏膜或引起肠道微生物菌群失调,亦可二者相互作用共同造成致病菌的定殖感染而发病^[3]。

益生菌可调节肠道菌群平衡及肠道微环境、增强胃肠粘膜屏障功能、抑制病原菌定殖,因此常用于 AAD 的预防和治疗^[4-5]。乳杆菌和双歧杆菌是肠道微生物中最常见的有益微生物^[1,6-8]。口服乳杆菌如植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)能够调节肠道上皮通透性,影响肠道紧密连接蛋白的表达和分布^[9],同时可通过促进抗炎细胞因子及抑制促炎细胞因子来增强机体免疫系统^[10-12]。双歧杆菌则可显著增加肠道菌群多样性,抑制某些致病菌(如变形菌)的丰度,缓解胃肠道相关疾病^[1,13]。目前市场上的益生菌产品以单一菌株制剂居多。不同菌株效果各异,相较于单一菌株,复合益生菌菌株更多且菌株间可能产生的协同作用是单菌株制剂所不具备的^[14]。Wu 等^[15]研究发现含有长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)、嗜酸乳杆菌和粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)的益生菌制剂可降低抗生素引起的肠道菌群失调发生率。此外,有研究表明服用乳双歧杆菌 XLTG11(*Bifidobacterium lactis* XLTG11)、干酪乳杆菌 Zhang(*Lactobacillus casei* Zhang)、植物乳杆菌 CCFM8661(*Lactobacillus plantarum* CCFM8661)和鼠李糖乳杆菌 Probio-M9(*Lactobacillus rhamnosus* Probio-M9)组成的复合益生菌制剂能够通过调节肠道菌群和增强肠道屏障功能显著改善氨苄西林诱导的小鼠 AAD 症状^[1]。实验室前期研究发现由乳杆菌(嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌、鼠李糖乳杆菌)及动物双歧杆菌乳亚种(*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*)组成的复合益生菌具有缓解腹泻的作用^[16],但尚未进行进一步的机制研究。

因此,本研究旨在通过构建 AAD 模型小鼠,从结肠上皮结构和功能、肠道菌群及其代谢产物等方面探究复合益生菌对其的改善作用,以期复合益生菌产品的开发和利用提供更多的数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

SPF 级雄性 6 周龄 18~20 g BALB/C 小鼠 广东省医学实验动物中心,生产许可证号 SCXK(粤)2022-0002; 益生菌制剂(植物乳杆菌 LPPerfectus®001+鼠李糖乳杆菌 LRPerfectusTM158+鼠李糖乳杆菌 HN001+嗜酸乳杆菌 NCFM+动物双歧杆菌乳亚种 HN019+赤藓糖醇+低聚果糖+蓝莓粉) 活菌数不低于 1.0×10^{10} CFU/g(其中乳杆菌总数为 1.9×10^{10} CFU/g,双歧杆菌总数为 4.0×10^9 CFU/g),完美(广东)日用品有限公司; 盐酸克林霉素 北京索莱宝科技有限公司; 氨苄青霉素钠 美国 Sigma 公司; 链霉素 北京兰博利德生物公司; DNA 提取试剂盒 杭州博日科技有限公司; RNA 提取试剂盒 北京全式金生物科技有限公司; DNA Prep 试剂盒 美国 Illumina 公司; qPCR Master Mix、HiScript III RT SuperMix for gPCR 南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

JCS-110001C 电子天平 德国松净公司; KZ-III-FP 高通量组织研磨仪 武汉赛维尔生物科技有限公司; 3-30K 离心机 美国 Sigma 公司; Synergy H1m 酶标仪 美国 BioTek 公司; LightCycler 96 荧光定量 PCR 仪 瑞士 Roche 公司; Agilent 7890A 气相色谱仪、Agilent 5977C 质谱仪 美国安捷伦公司; NextSeq2000 测序仪 美国 Illumina 公司; Eclipse Ci-L 正置白光拍照显微镜 日本 Nikon 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组与给药 将 30 只小鼠适应性喂养一周后,随机分为 3 组进行实验:空白组、模型组、复合益生菌组,每组 10 只。造模期间,空白组给予等量磷酸盐缓冲液灌胃,模型组及复合益生菌组每天进行抗生素混合溶液(克林霉素 0.848 g/kg+氨苄青霉素钠 0.942 g/kg+链霉素 0.471 g/kg)灌胃造模,连续 7 d,每日 1 次。造模结束后,根据前期研究^[16-17]得出复合益生菌组给予复合益生菌混悬液 1.85 g/kg,空白组和模型组给予磷酸盐缓冲液,灌胃体积 0.1 mL/10 g,每日 1 次,连续给药 7 d。所有动物试验操作均获得了完美(广东)日用品有限公司动物伦理委员会批准(NO: WM-GD-DW006)。

1.2.2 观察指标及腹泻评估 观察小鼠一般生理状态(如精神、毛发、饮食、粪便形状等),腹泻状况根据粪便含水量和粪便稠度进行评估。造模成功判断标准:小鼠毛发粗糙,精神萎靡,肛周污秽,屁股有明显污迹,或模型组与空白组相比,粪便含水量和粪便稠

度评分具有统计学差异^[13]。粪便稠度评分标准(见图 1)为: a.成形,粪便保持其形状,棕色,为 1 分; b.半成型或柔软,不流动、黄色,为 2 分; c.液体和不成形,黄色,为 3 分^[18]。笼内铺纸收集小鼠 2 h 内的新鲜粪便于 EP 管中,称重后 100 ℃ 恒温烘 2 h 至完全烘干状态,再次称重并计算粪便含水量。

粪便含水量(%) = $\frac{\text{粪便湿重} - \text{粪便干重}}{\text{粪便湿重} - \text{EP管重}} \times 100$



图 1 粪便稠度评分
Fig.1 Scoring criteria for fecal consistency

1.2.3 结肠组织切片 取小鼠远端结肠组织,放入 4% 的多聚甲醛中固定 24 h 后进行石蜡包埋、切片,并用苏木素-伊红染色(Hematoxylin-eosin staining, HE),观察结肠切片的病理情况。

1.2.4 肠道屏障相关基因表达水平 利用荧光定量 PCR 法检测肠道屏障紧密连接蛋白 occludin、claudin-1 和 ZO-1 的 mRNA 表达水平。取约 50 mg 结肠组织样本,组织研磨仪匀浆,参照试剂盒说明书进行结肠组织总 RNA 提取及反转录合成 cDNA 步骤。以 cDNA 为模板,通过 ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix 和特定的引物(序列见表 1)进行扩增,通过荧光信号积累进行定量反应。反应体系: 10 μL qPCR Master Mix, 0.4 μL Primer 1, 0.4 μL Primer 2, 1 μL cDNA, 8.2 μL ddH₂O。反应条件: 95 ℃ 预变性 30 s, 95 ℃、10 s, 60 ℃、20 s, 循环 40 次。以 2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因 mRNA 相对表达水平。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
<i>β-actin</i>	CATTGCTGACAGGATGCAG AAGG	TGCTGGAAGGTGGACAGT GAGG
<i>occludin</i>	CCCTCTTTCCTTAGCGGACA	CCCAAGATAAGCGAACCT GC
<i>claudin-1</i>	GGACTGTGGATGTCCTGCG TTT	GCCAATTACCATCAAGGC TCGG
<i>ZO-1</i>	GTTGGTACGGTGCCCTGAA AGA	GCTGACAGGTAGGACAG ACGAT

1.2.5 短链脂肪酸含量测定 准确称取 (0.05±0.001)g 粪便于 EP 管中,加入 0.75 mL 磷酸(1.0% v/v)溶液,加入钢珠涡旋混匀并冰浴超声 10 min,在 12000 r/min、4 ℃ 条件下离心 10 min。取上清 200 μL 至新 EP 管中,加入 500 μL 甲基叔丁基醚,涡旋混匀后冰浴下超声 10 min,在 12000 r/min、4 ℃ 条件下离心 10 min,取上清 200 μL 于管中待测。色谱质

谱条件: 进样量 1 μL,不分流进样,色谱柱流速 1 mL/min。进样口温度 240 ℃,离子源温度 230 ℃,传输线温度 240 ℃。程序升温起始温度 80 ℃,保持 1 min;然后以 5 ℃/min 升温至 150 ℃,维持 0 min;再以 40 ℃/min 升温至 230 ℃,保持 8 min。载气为氦气,载气流速 3.0 mL/min。

1.2.6 小鼠粪便菌群分析 每组随机抽取 5 只小鼠,取适量小鼠粪便提取 DNA,质控后进行建库,质量合格的文库通过 Illumina NextSeq2000 平台进行测序。基于原始测序数据 Raw data,通过 kneaddata 进行质量控制并去除宿主序列得到 Clean data,通过 FastQC 对 Clean data 进行质量评估。然后对 Clean data 进行组装、基因预测和定量,将得到的基因与 NR 数据进行比对,获得样本物种注释和分类。在上述分析的基础上,进行种类组成、相关性、群落多样性、差异比较等一系列的统计学分析和可视化。

1.3 数据处理

除肠道菌群外的数据使用 SPSS 27.0 软件进行统计分析,满足正态分布或方差齐的数据采用 ANOVA 分析,不满足正态分布、方差齐的数据采用非参数检验。作图软件使用 Rstudio v4.2.1、GraphPad Prism 8 及 Cytoscape v3.10.2。

2 结果与分析

2.1 小鼠的表观变化

根据小鼠一般状态及腹泻情况结果(图 2),复合益生菌对 AAD 小鼠的腹泻症状具有一定缓解作用。造模期间,空白组小鼠精神状态良好、毛发光

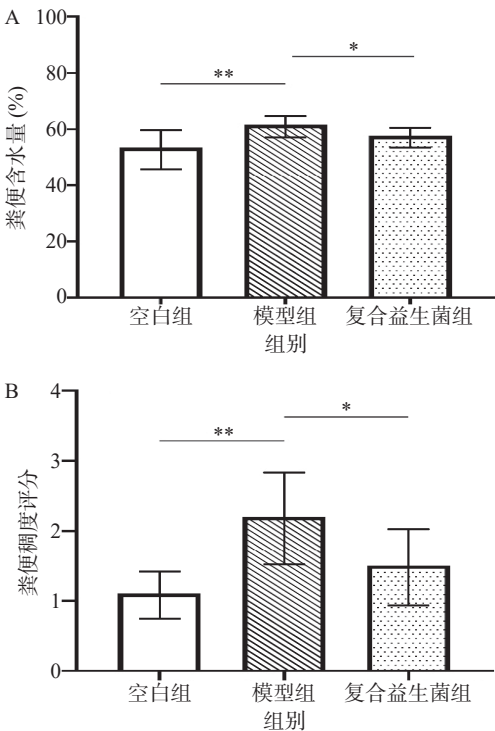


图 2 小鼠腹泻情况

Fig.2 Diarrhea degree of mice

注: *表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$, 图 4~图 6 同。

滑、尾部肛门处干净且未见红肿;其余组小鼠毛发粗糙、行动迟缓无力、部分小鼠肛周毛发潮湿且带些许粪便。停止造模后以上症状均逐渐改善。与空白组相比,模型组小鼠的粪便含水量及腹泻评分均极显著增加($P<0.01$),说明造模成功。与模型组相比,复合益生菌组可显著降低小鼠的粪便含水量、腹泻评分($P<0.05$)。

2.2 结肠病理情况分析

HE 染色结果显示(图 3),空白组肠组织形态结构正常,肠腺数量丰富。模型组可见固有层淋巴细胞浸润较多;少量肠腺扩张。复合益生菌组固有层炎性细胞减少,腺体排列整齐且较模型组更紧密,未见其他结构异常,说明复合益生菌对改善小鼠肠道形态结构具有积极作用。

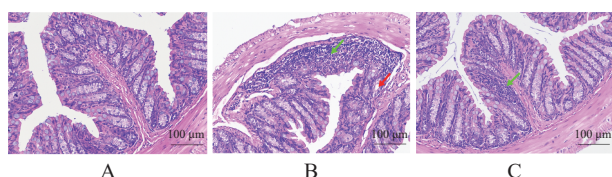


图3 各组结肠组织病理学观察(HE染色, 200×)

Fig.3 Pathological observations of colon tissue in each group (HE staining, 200×)

注: A.空白组; B.模型组; C.复合益生菌组。绿色箭头指淋巴细胞浸润,红色箭头指肠腺扩张。

2.3 紧密连接蛋白 mRNA 表达水平

紧密连接蛋白在肠道上皮细胞间形成紧密连接,维持肠道屏障功能,其功能障碍可能导致肠道通透性增加,从而引发腹泻^[19]。其中, claudin-1、occludin 和 ZO-1 是主要的紧密连接蛋白,可用于评估紧密连接的功能状态^[20-21]。如图 4 所示,相比于空白组,模型组小鼠结肠 occludin、ZO-1 和 claudin-1 表达水平显著下调($P<0.05$),表明抗生素处理造成肠道屏障功能受损。与模型组相比,复合益生菌组可显著上调 occludin 和 ZO-1 的 mRNA 表达水平($P<0.05$),而 claudin-1 表达水平亦呈上升趋势。Li 等^[1]发现混合益生菌制剂可显著提高氨苄西林处理后 AAD 小鼠结肠组织中 ZO-1、occludin、claudin-1 和 MUC2 的 mRNA 表达水平,有助保持肠道屏障的完整性,这与本研究结果相似。上述结果表明,复合益生菌可通过提高紧密连接蛋白相关基因的 mRNA 相对表达量,缓解 AAD 小鼠肠道屏障功能损伤,降低肠粘膜通透性,从而减轻腹泻相关症状。

2.4 短链脂肪酸含量变化

短链脂肪酸(Short chain fatty acids, SCFAs)是肠道微生物群落的主要代谢产物,不仅为肠上皮细胞提供重要的营养来源,而且在调节肠道微环境、抑制炎症反应以及增强肠道屏障完整性方面发挥着关键作用^[22]。由图 5 可知,模型组与空白组相比,乙酸、丙酸和丁酸含量均极显著减少($P<0.01$),说明抗生素使短链脂肪酸水平急速下降。给予复合益生菌后,乙

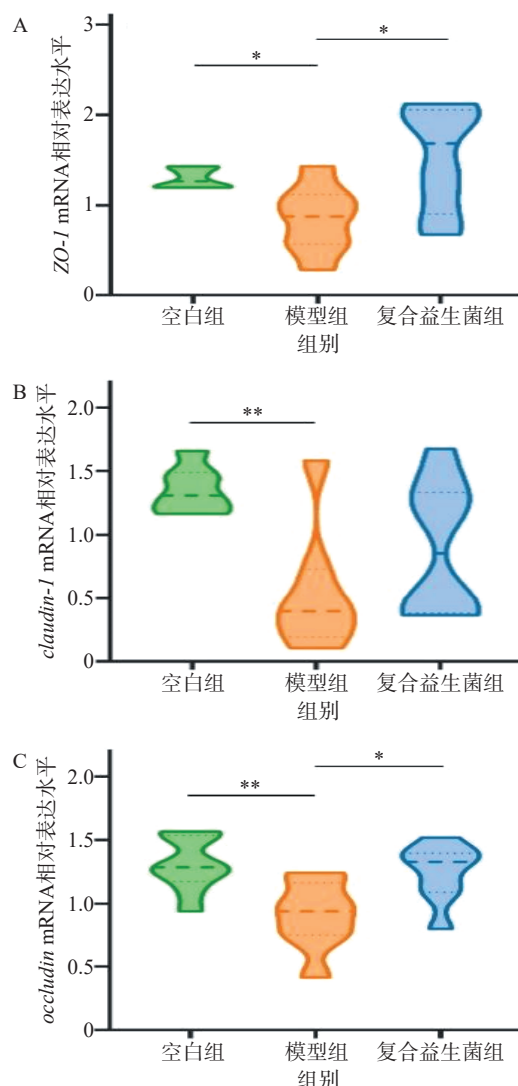


图4 小鼠肠道屏障基因相对表达水平

Fig.4 Intestinal barrier related gene relative expression in colonic tissues of mice

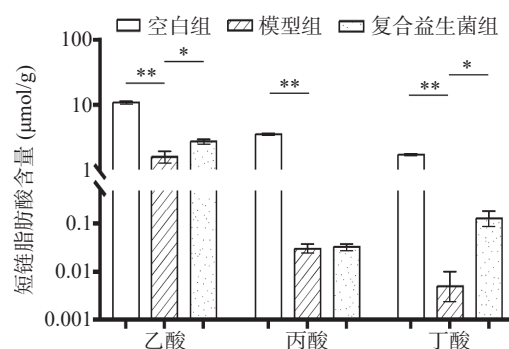


图5 小鼠粪便短链脂肪酸含量

Fig.5 Short chain fatty acid contents in the feces of mice

酸与丁酸含量均较模型组显著增加($P<0.05$),丙酸含量轻微上升但无显著性影响。服用抗生素会引起肠道菌群紊乱,可能导致肠道中未吸收的碳水化合物发酵过程受阻,减少 SCFAs 的生成,进而降低结肠对电解质和水的吸收,诱发 AAD^[23]。研究表明,益生菌可通过生成 SCFAs 或为产 SCFAs 的细菌提供更适宜的环境(如降低肠道 pH 和氧气水平),促进 SCFAs

的生成^[5]。本研究结果与之一致,复合益生菌组中乙酸、丙酸和丁酸含量均呈增加趋势,表明复合益生菌对肠道 SCFAs 的生成具有一定促进作用。

2.5 肠道菌群群落结构分析

2.5.1 肠道菌群多样性及聚类 α 多样性能够反映肠道菌群的物种丰富度和多样性, β 多样性反映两组及多组中菌落物种组成及功能的整体比较^[2]。结果如图 6 所示,模型组小鼠肠道菌群的 Shannon 和 Simpson 多样性指数均极显著低于空白组($P<0.01$),给予复合益生菌后菌群多样性极显著回升($P<0.01$)。表明抗生素会抑制或杀死大量肠道微生物,严重破坏

肠道菌群平衡,而复合益生菌可有助调节或恢复小鼠肠道菌群的多样性。PCoA 结果显示不同处理组之间的小鼠肠道菌群结构可显著区分,聚为不同类群。而物种相关性热图及聚类中,空白组和复合益生菌组的菌群更为接近,表明益生菌可一定程度上恢复肠道菌群结构。

2.5.2 肠道菌群物种组成变化 肠道菌群失衡是引发和加剧腹泻不可忽视的重要因素^[24]。为直观体现小鼠肠道菌群总丰度前 10 的物种在各组间的比例变化,绘制了相对丰度柱形图(图 7)。厚壁菌门(Bacillota)在空白组中的平均相对丰度为

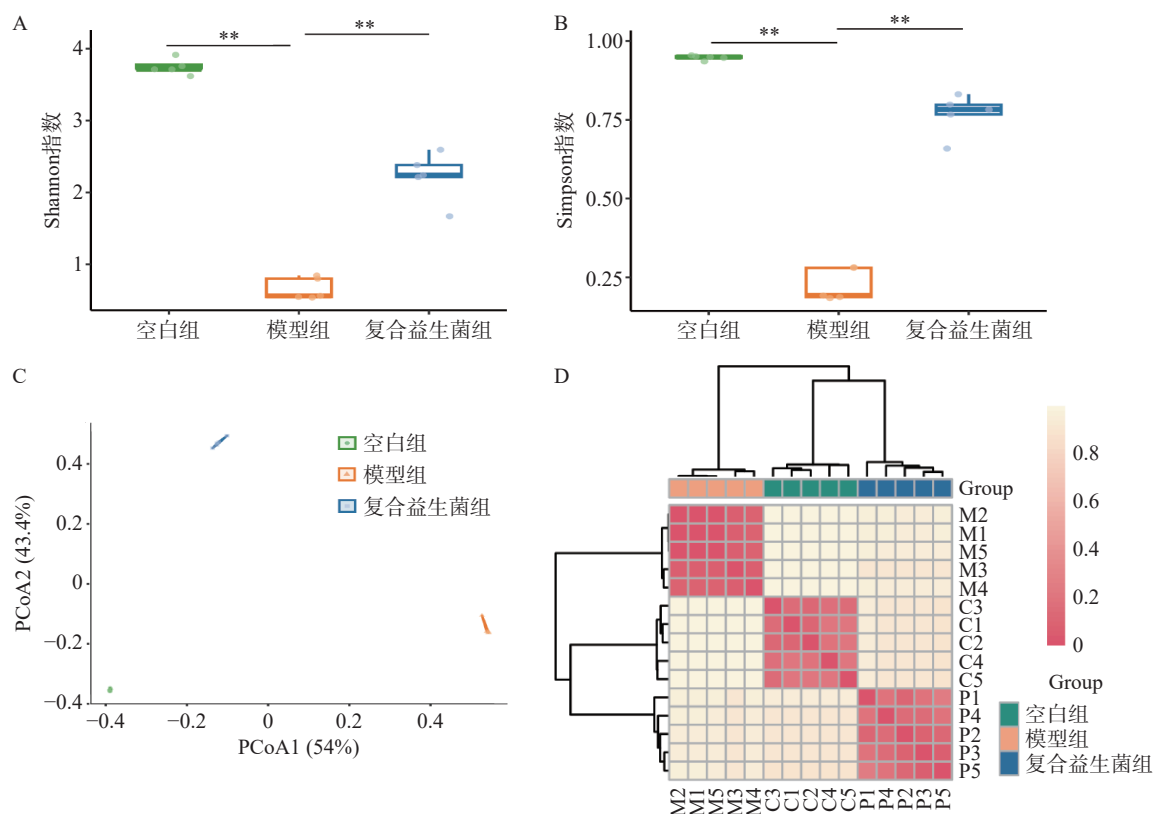
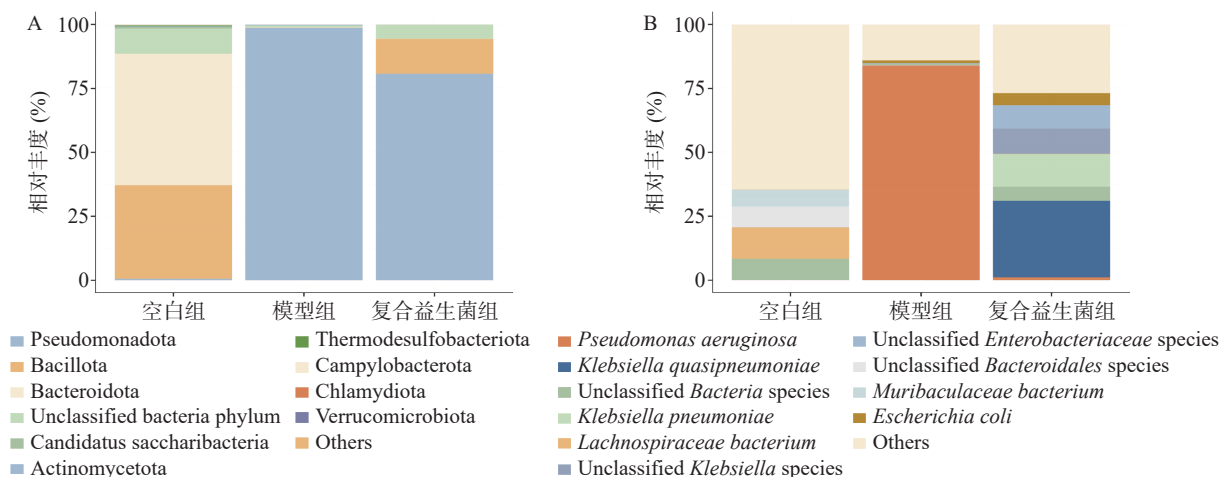


图 6 小鼠肠道菌群 α 多样性结果和 β 多样性结果

Fig.6 Alpha diversity and Beta diversity of intestinal flora of mice

注: A.Shannon 多样性指数; B.Simpson 多样性指数; C.PCoA 主坐标分析二维排序图; D.物种相关性热图。图 D 中 C: 空白组; M: 模型组 P: 复合益生菌组。



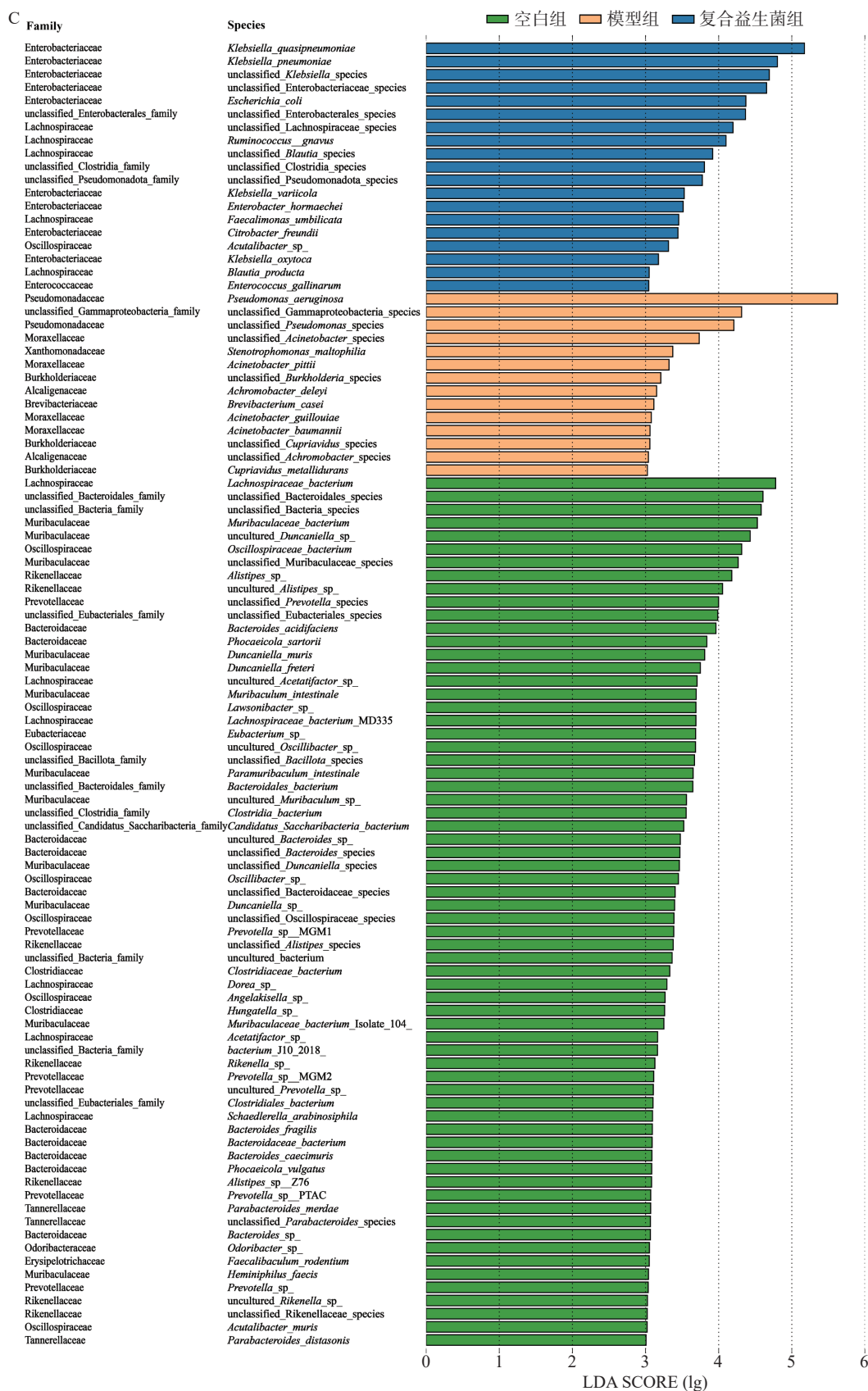


图 7 各组小鼠肠道菌群种类组成

Fig.7 Intestinal flora composition of mice in each group

注: A.门水平相对丰度图; B.种水平相对丰度图; C. LEfSe 分析。

36.57%。相较于空白组,模型组小鼠肠道中厚壁菌门相对丰度急速减少,平均占比<0.20%;假单胞菌门(*Pseudomonadota*)相对丰度增加且占绝对优势,

平均占比为 98.68%。给予复合益生菌后,假单胞菌门相对丰度减少,厚壁菌门相对丰度增加,分别为 80.71% 和 13.64%。厚壁菌门为正常肠道中主要的

微生物群落之一, 包含毛螺菌科(Lachnospiraceae)、颤螺旋菌科(Oscillospiraceae)等众多益生菌, 其丰度升高有利于恢复肠道健康^[25]。

在种水平, 模型组铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)占比为 83.93%, 其余种占比均<1.00%。LEfSe 结果亦表明(图 7C), 模型组主要富集铜绿假单胞菌和未分类变形菌(unclassified Gammaproteobacteria species)等菌。与模型组相比, 复合益生菌组铜绿假单胞菌相对丰度减少至 1.11%。同时, 肠道菌群中主要物种比例发生变化, 不再由单一菌种主导, 而是呈现出更加均衡的微生物组成。复合益生菌组富集以 *Ruminococcus gnavus*、*Blautia Producta* 和 *Faecalimonas umbilicata* 为代表的毛螺菌科有益菌, 以及类肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella quasipneumoniae*)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)等中性菌。毛螺菌科物种参与多种短链脂肪酸的合成^[26], 如 *Ruminococcus gnavus*、*Blautia producta* 和 *Faecalimonas umbilicata* 均有研究指出与短链脂肪酸水平的升高呈正相关^[2,27-28]。此外, *Blautia producta* 还在抑制炎症反应、维持肠道屏障、抑制 TLR4/NF- κ B 通路、调节肠道菌群平衡中发挥作用^[29]。在针对结直肠癌患者结肠组织的研究中发现, *Ruminococcus gnavus* 及 *Blautia producta* 在正常组织中富集, 可降低溶血甘油磷脂以促进 CD8⁺T 细胞的活化, 延缓结

直肠癌的发展进程^[30]。模型组以铜绿假单胞菌占绝对优势, 该菌为中性菌, 但在特定条件下会变为致病菌对机体产生危害。当服用抗生素后肠道大部分正常菌群被破坏, 铜绿假单胞菌因其自身特性对抗生素具有抗药性而大量增殖, 导致肠道菌群比例严重失调引发疾病^[31]。与模型相比, 复合益生菌组铜绿假单胞菌被抑制, 菌群比例更为均衡, 然而较空白组仍具一定比例的中性菌, 这可能是肠道菌群仍处于恢复阶段。因此, 复合益生菌可重塑肠道菌群的种类组成, 推测毛螺菌科可能在调节肠道菌群平衡中发挥重要作用。

2.5.3 菌群共现网络 为进一步分析毛螺菌科物种在肠道菌群中的作用, 基于 Spearman 相关性系数构建复合益生菌组菌群共现网络。如图 8 所示, 毛螺菌科物种如 unclassified Lachnospiraceae species、*Blautia producta*、*Faecalimonas umbilicata* 等与该科级分类下的其他物种, 及肠球菌科(Enterococcaceae)和颤螺旋菌科(Oscillospiraceae)等其他产短链脂肪酸的有益菌呈正相关, 而直接或间接地与铜绿假单胞菌、未分类变形菌、未分类假单胞菌(unclassified Pseudomonas species)等条件致病菌呈负相关。这验证了长期服用鼠李糖乳杆菌、嗜酸乳杆菌类益生菌可使肠道中共生菌毛螺菌科丰度增加^[32-33], 有益共生菌的增殖可抑制致病菌的定殖^[2], 同时促进其他菌的生长, 修复肠道菌群失调。

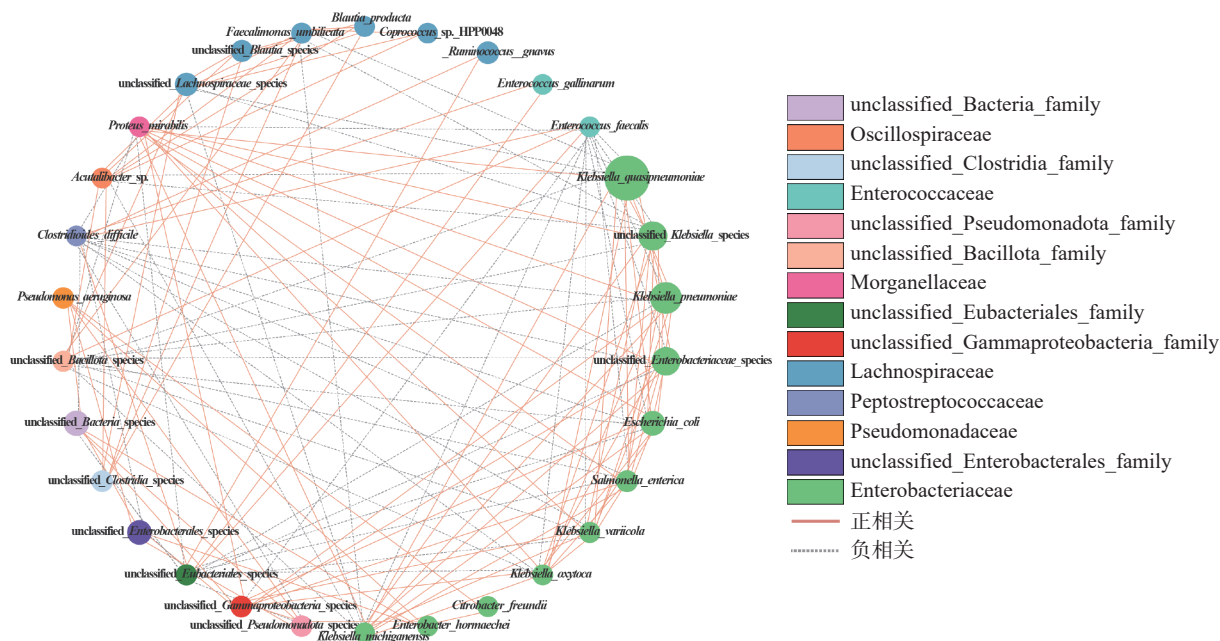


图 8 菌群共现网络分析

Fig.8 Co-occurrence network of intestinal flora

注: 图中仅显示该组丰度前 30、相关性>0.6 且 $P<0.05$ 的物种, 点的大小表示该物种丰度。

3 结论

本研究利用三联抗生素诱导 AAD 小鼠模型, 连续给予复合益生菌 7 d 后, 小鼠腹泻情况得到改善, 结肠病理分析显示炎症细胞浸润减少且组织结构更加紧密, 同时紧密连接蛋白(*claudin-1*、*occludin* 和

ZO-1)的 mRNA 表达水平以及短链脂肪酸(乙酸、丙酸和丁酸)含量均上升。肠道菌群分析表明, 复合益生菌组一定程度上调节了 AAD 小鼠的肠道菌群失衡, 显著提高菌群的生物多样性, 以 *Ruminococcus gnavus*、*Blautia producta* 为代表的毛螺菌科有益菌

在该组大量富集。此外,菌群互作中毛螺菌科与其他有益菌呈正相关,而与致病菌或条件致病菌呈负相关,推测其在抑制致病菌增殖、改善肠道环境及屏障功能中发挥着关键作用。通过本实验结果可知,由嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌、鼠李糖乳杆菌及动物双歧杆菌乳亚种组成的复合益生菌通过调节肠道环境或菌群相互作用,促进肠道有益共生菌增殖,抑制致病菌生长,进而恢复肠道菌群平衡和增强肠道屏障功能,达到缓解抗生素相关性腹泻症状的效果。可能由于益生菌干预时间较短,肠道菌群及其微环境尚未完全恢复。目前在实际应用中,关于益生菌干预时长尚无统一标准,因此需要进一步探索不同干预时长对肠道菌群恢复和AAD改善的影响。此外,本研究未从信号通路、基因表达调控等方面详细阐明益生菌发挥作用的具体机制,这也需在未来研究中加以深入探讨。

© The Author(s) 2025. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] LI W, ZHANG S, WANG Y, et al. Complex probiotics alleviate ampicillin-induced antibiotic-associated diarrhea in mice[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1156058.
- [2] 苏钢, 杨光勇, 张庚鑫, 等. 基于肠道菌群探究葛根芩连汤短期治疗抗生素相关性腹泻[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(9): 2049–2053. [SU G, YANG G Y, ZHANG G X, et al. To study on the short-term treatment of antibiotic-associated diarrhea with Gegen Qinlian decoction based on intestinal flora[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2023, 34(9): 2049–2053.]
- [3] 杨璐嘉, 来智慧, 官松美, 等. 几种临床常用抗生素诱导小鼠腹泻的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2020, 45(8): 825–833. [YANG L J, LAI Z H, GUAN S M, et al. Study on diarrhea induced by several commonly used antibiotics in mice[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2020, 45(8): 825–833.]
- [4] 邹标, 舒赛男. 益生菌在儿童抗生素相关性腹泻应用进展[J]. 中国实用儿科杂志, 2024, 39(1): 36–42. [ZOU B, SHU S N. Application progress of probiotics in the antibiotic associated diarrhea in children[J]. *Chinese Journal of Practical Pediatrics*, 2024, 39(1): 36–42.]
- [5] MEKONNEN S A, MERENSTEIN D, FRASER C M, et al. Molecular mechanisms of probiotic prevention of antibiotic-associated diarrhea[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 61: 226–234.
- [6] WANG J, JI H, WANG S, et al. Probiotic *Lactobacillus plantarum* promotes intestinal barrier function by strengthening the epithelium and modulating gut microbiota[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1953.
- [7] TURRONI F, MILANI C, DURANTI S, et al. Bifidobacteria and the infant gut: An example of co-evolution and natural selection[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2018, 75(1): 103–118.
- [8] FERNÁNDEZ-CIGANDA S, FRAGA M, ZUNINO P. Probiotic *Lactobacilli* administration induces changes in the fecal microbiota of preweaned dairy calves[J]. *Probiotics and Antimicrobial*
- Proteins*, 2022, 14(5): 804–815.
- [9] ANDERSON R C, COOKSON A L, MCNABB W C, et al. *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation[J]. *BMC Microbiology*, 2010, 10(1): 316.
- [10] KOPP M V, GOLDSTEIN M, DIETSCHEK A, et al. *Lactobacillus* GG has *in vitro* effects on enhanced interleukin-10 and interferon- γ release of mononuclear cells but no *in vivo* effects in supplemented mothers and their neonates[J]. *Clinical & Experimental Allergy*, 2008, 38(4): 602–610.
- [11] VILLENA J, CHIBA E, VIZOSO-PINTO M, et al. Immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* strains differentially modulate antiviral immune response in porcine intestinal epithelial and antigen presenting cells[J]. *BMC Microbiology*, 2014, 14(1): 126.
- [12] FARKAS O, MÁTIS G, PÁSZTI-GERE E, et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* 2142 and sodium n-butyrate in lipopolysaccharide-triggered inflammation: Comparison of a porcine intestinal epithelial cell line and primary hepatocyte monocultures with a porcine enterohepatic co-culture system[J]. *Journal of Animal Science*, 2014, 92(9): 3835–3845.
- [13] XU B, LIANG S, ZHAO J, et al. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* XLTG11 improves antibiotic-related diarrhea by alleviating inflammation, enhancing intestinal barrier function and regulating intestinal flora[J]. *Food & Function*, 2022, 13(11): 6404–6418.
- [14] 牟龙恺, 史晓丹, 杨雨宁, 等. 复合益生菌改善免疫低下效果研究[J]. 中国乳品工业, 2024, 52(8): 1–11. [MU L K, SHI X D, YANG Y N, et al. Study on the effect of compound probiotics on improving immunosuppression[J]. *China Dairy Industry*, 2024, 52(8): 1–11.]
- [15] WU J, GAN T, ZHANG Y, et al. The prophylactic effects of BIFICO on the antibiotic-induced gut dysbiosis and gut microbiota[J]. *Gut Pathogens*, 2020, 12(1): 41.
- [16] 吴绮霞, 高前程, 梁枝聪, 等. 一款益生菌复合制剂双向调节斑马鱼肠道动力作用研究[J]. 现代食品, 2023, 29(21): 204–209. [WU Q X, GAO Q C, LIANG Z C, et al. A study on the bidirectional regulation of zebrafish intestinal motility by a probiotic complex preparation[J]. *Modern Food*, 2023, 29(21): 204–209.]
- [17] 戴明珠, 郭胜亚, 徐懿乔, 等. 用于功效评价的斑马鱼转换人用剂量的换算方法: 中国, 202010256107.8[P]. 2021-10-12. [DAI M Z, GUO S Y, XU Y Q, et al. Conversion method of zebrafish dose to human dose for efficacy evaluation; China, 202010256107.8[P]. 2021-10-12.]
- [18] 马岩, 王中江, 杨靖瑜, 等. 动物双歧杆菌乳亚种 XLTG11 对克林霉素诱导的抗生素相关性腹泻的改善作用[J]. 食品科学, 2023, 44(3): 170–178. [MA Y, WANG Z J, YANG J Y, et al. Alleviative effect of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* XLTG11 on antibiotic-associated diarrhea induced by clindamycin[J]. *Food Science*, 2023, 44(3): 170–178.]
- [19] GUO H, YU L, TIAN F, et al. Effects of bacteroides-based microecologies against antibiotic-associated diarrhea in mice[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(12): 2492.
- [20] CAPALDO C T, POWELL D N, KALMAN D. Layered defense: How mucus and tight junctions seal the intestinal barrier[J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2017, 95(9): 927–934.
- [21] 赵丽. 腹泻型肠易激综合征大鼠肠道菌群和肠道屏障功能的变化及相关分子机制的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2020. [ZHAO L. Changes in intestinal flora and intestinal barrier func-

tion in diarrhea-predominant IBS rats and related molecular mechanisms[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2020.]

- [22] HAGIHARA M, KUROKI Y, ARIYOSHI T, et al. *Clostridium butyricum* modulates the microbiome to protect intestinal barrier function in mice with antibiotic-induced dysbiosis[J]. *iScience*, 2020, 23(1): 100772.
- [23] BINDER H J. Role of colonic short-chain fatty acid transport in diarrhea[J]. *Annual Review of Physiology*, 2010, 72(1): 297–313.
- [24] LIU C, SONG C, WANG Y, et al. Deep-fried *Atractylodes lancea* rhizome alleviates spleen deficiency diarrhea-induced short-chain fatty acid metabolic disorder in mice by remodeling the intestinal flora[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2023, 303: 115967.
- [25] 张学强, 章从恩, 于小红, 等. 干姜改善抗生素相关性腹泻及对肠道菌群的作用研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(5): 1316–1326. [ZAHNG X Q, ZHANG C E, YU X H, et al. Modulation of gut microbiota during alleviation of antibiotic-associated diarrhea with Zingiberis Rhizoma[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2022, 47(5): 1316–1326.]
- [26] 曾祥瑞, 姜彩霞, 刘晓兰, 等. 玉米皮可溶性膳食纤维对洛哌丁胺诱导小鼠便秘的作用及机制[J]. 食品工业科技, 2025, 46(4): 374–384. [ZENG X R, JIANG C X, LIU X L, et al. Effect and mechanism of soluble dietary fiber from corn bran on loperamide-induced constipation in mice[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2025, 46(4): 374–384.]
- [27] WANG G, WANG X, MA Y, et al. *Lactobacillus reuteri* improves the development and maturation of fecal microbiota in piglets through mother-to-infant microbe and metabolite vertical transmission[J]. *Microbiome*, 2022, 10(1): 211.
- [28] SAKAMOTO M, IKEYAMA N, YUKI M, et al. Draft genome sequence of *Faecalimonas umbilicata* JCM 30896T, an acetate-producing bacterium isolated from human feces[J]. *Microbiology Resource Announcements*, 2018, 7(9): e01091–18.
- [29] MAO B, GUO W, CUI S, et al. *Blautia producta* displays potential probiotic properties against dextran sulfate sodium-induced colitis in mice[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2024, 13(2): 709–720.
- [30] ZHANG X, YU D, WU D, et al. Tissue-resident Lachnospiraceae family bacteria protect against colorectal carcinogenesis by promoting tumor immune surveillance[J]. *Cell Host & Microbe*, 2023, 31(3): 418–432.e8.
- [31] SATHE N, BEECH P, CROFT L, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: Infections and novel approaches to treatment "Knowing the enemy" the threat of *Pseudomonas aeruginosa* and exploring novel approaches to treatment[J]. *Infectious Medicine*, 2023, 2(3): 178–194.
- [32] KORPELA K, SALONEN A, VIRTÄ L J, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG intake modifies preschool children's intestinal microbiota, alleviates penicillin-associated changes, and reduces antibiotic use[J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0154012.
- [33] TOSCANO M, de GRANDI R, STRONATI L, et al. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bifidobacterium longum* BB536 on the healthy gut microbiota composition at phyla and species level: A preliminary study[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2017, 23(15): 2696.