产不同细菌素的格氏乳杆菌对小鼠肠道微生态的影响

胡静怡， 杨 波*， 赵建新， 张 灏， 陈 卫
（江南大学 食品学院，江苏 无锡 214122）

摘要： 目前已发现格氏乳杆菌（*Lactobacillus gasseri*，*L. gasseri*）产生的多种细菌素对多种致病菌具有抑制作用，但有关细菌素对格氏乳杆菌和宿主肠道微生态之间关系的研究较少。为探究产不同细菌素的格氏乳杆菌及其对小鼠肠道微生态的影响，作者通过细菌素操纵子预测、抑菌试验以及液相色谱－质谱联用法证明了格氏乳杆菌 FNMGHLBE6L1、FNMGHLBE20L5、FHNFQ16L5 可产不同细菌素，之后通过动物试验探究不同格氏乳杆菌对小鼠肠道微生态的影响。结果表明，3 株格氏乳杆菌均对小鼠肠道菌群的多样性及菌群结构产生了显著影响；且格氏乳杆菌显著降低了小鼠结肠中白介素-1β 的水平。综上，产不同细菌素的格氏乳杆菌可对宿主肠道菌群产生显著影响，且菌株间的差异与所产细菌素存在相关性。该研究为探究产不同细菌素的格氏乳杆菌与肠道菌群之间的关联提供了依据。

关键词： 格氏乳杆菌；细菌素；肠道菌群
中图分类号：TS 201.3　　**文章编号：**1673-1689(2024)06-0001-10　　DOI：10.12441/spyswjs.20230103004

Effect of *Lactobacillus gasseri* with Different Bacteriocins Production on the Intestinal Micro-Ecology in Mice

HU Jingyi， *YANG Bo**， *ZHAO Jianxin*， *ZHANG Hao*， *CHEN Wei*
（School of Food Science and Technology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract： It has been reported that *Lactobacillus gasseri* produces a variety of bacteriocins that inhibit a few kinds of food pathogenic bacteria, but there are few researches on how bacteriocins affect the interaction between *Lactobacillus gasseri* and the intestinal microecology. This study utilized the in *silico* prediction of bacteriocin operon, antibacterial experiment with six strains of food-borne pathogenic bacteria as indicators and liquid chromatograph mass-spectrometer/mass spectrometer analysis to prove that *Lactobacillus gasseri* FNMGHLBE6L1, FNMGHLBE20L5 and FHNFQ16L5 produced different bacteriocins. Through the animal experiments, the effects of three bacteriocin-producing *Lactobacillus gasseri* strains on the intestinal microecology of the mice were investigated. The diversity and profile of the gut microbiota were dramatically influenced by all three strains of *Lactobacillus gasseri*, and the level of colonic interleukin-1β was also significantly decreased. In summary, the gut microbiota was significantly affected by bacteriocin-producing *Lactobacillus gasseri*, and the variations in effects among strains were associated with their

收稿日期： 2023-01-03　　**修回日期：** 2023-03-06
基金项目： 国家自然科学基金创新研究群体项目（32021005）。
* **通信作者：** 杨 波（1985—），男，博士，研究员，博士研究生导师，主要从事食品生物技术研究。E-mail：bo.yang@jiangnan.edu.cn

bacteriocin production. This study could serve as a guide for future research on the relationship between various bacteriocin-producing *Lactobacillus gasseri* and the gut microbiota.

Keywords: *Lactobacillus gasseri*, bacteriocin, gut microbiota

格氏乳杆菌是一类天然存在于口腔、胃肠道等黏膜的乳酸菌,在肠道菌群中占主导地位[1]。研究发现,*L. gasseri* CECT5714 可促进肠道 IgA 分泌,上调丁酸水平,维持肠道稳态,增加儿童肠道防御能力[2-3]。细菌素是一类乳酸菌代谢过程中核糖体合成的具有抑菌能力的多肽或蛋白质类物质[4-5],是格氏乳杆菌与宿主相互作用的物质基础之一,具有促进产生菌定植、抑制竞争菌等功能[6]。人体肠道菌群结构复杂,长期服用抗生素会降低宿主肠道菌群微生物的浓度[7-8],抗生素的广谱抗菌性使其对肠道菌群的影响难以预测。细菌素的抑菌谱相对较窄,且具有特异抑菌性,故细菌素是一类在肠道微生态相关疾病中极有潜力的抗生素替代品。

格氏乳杆菌可产生 Gassericin A、Gassericin T 等多种细菌素,对金黄色葡萄球菌、伤寒沙门氏菌等多种食源性致病菌具有抑制作用,少数对部分乳杆菌属菌株有抑制性[4,9-11]。Xiang 等发现 *L. gasseri* PA3 可提高 *Lactobacillus* 和 *Escherichia* 丰度,降低拟杆菌属和考拉杆菌属的丰度[12]。在以往研究中,大多数研究仅着眼于格氏乳杆菌所产细菌素的序列、结构等方面,并未关注到细菌素和格氏乳杆菌与肠道菌群之间的相互作用。作者以前期筛选到的 3 株格氏乳杆菌为研究对象,通过预测细菌素操纵子、牛津杯抑菌实验和液相色谱-质谱联用(liquid chromatograp-mass spectrometer/mass spectrometer,LC-MS/MS)法,验证其对多株食源性致病菌的抑制能力,通过灌胃小鼠格氏乳杆菌来探究产不同细菌素的格氏乳杆菌对小鼠肠道微生态的影响,以期发现格氏乳杆菌对小鼠肠道微生态的影响与格氏乳杆菌所产细菌素之间的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

胃蛋白酶(1:15 000)、胰蛋白酶(1:300)、过氧化氢酶(>3 000 U/mg)、硫酸链霉素:上海生工生物工程股份有限公司;甲酸:美国 Sigma-Aldrich 公司;乙腈:美国 ThermoFisher Scientific 公司;粪便 DNA 快速提取试剂盒:MP Biomedicals 有限公司;白介素-10(interleukin-10,IL-10)、白介素-6(IL-6)、白介素-17(IL-17)、白介素-1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)试剂盒:R&D 有限公司;BCA 蛋白质质量浓度测定试剂盒:碧云天生物技术有限公司;总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、甘油三酯(TG)检测试剂盒:南京建成生物技术公司;格氏乳杆菌 FNMGHLBE6L1、格氏乳杆菌 FNMGHLBE20L5、格氏乳杆菌 FHNFQ16L5、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* ATCC6538P、产肠毒素大肠杆菌 Enterotoxigenic *Escherichia coli* O78:K80、单核细胞增生李斯特菌 *Listeria monocytogenes* CCFM19、小肠结肠炎耶尔森菌 *Yersinia enterocolitica* CCFM633、鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium* CCFM629、肠炎沙门氏菌 *Salmonella enteritidis* CCFM628:江南大学食品生物技术中心菌种库。

1.2 仪器与设备

S1000 Touch™ 基因扩增仪、Gel Doc™ EZ imager 凝胶成像系统:美国 Bio-Rad 公司;毛细管高效液相色谱仪、电喷雾-组合型离子阱 Orbitrap 质谱仪:美国 ThermoFisher Scientific 公司;全自动生化分析仪:深圳迈瑞医疗有限公司。

1.3 格氏乳杆菌细菌素操纵子预测

使用 BAGEL4(http://bagel4.molgenrug.nl/)对格氏乳杆菌潜在细菌素进行预测。

1.4 发酵上清液的制备

参考岳月的方法[13]活化格氏乳杆菌,10 000 *g*离心 10 min,取上清液,经 0.22 μm 无菌滤膜过滤得到无菌发酵上清液。

1.5 牛津杯抑菌试验

将 1×10^6 CFU/mL 的指示菌稀释液涂布于固体培养基上,在平板上放置牛津杯,加入 100 μL 上清液,4 ℃扩散 4 h,37 ℃培养 16~18 h,观察并测定抑

菌圈直径。以MRS液体培养基为阴性对照,以链霉素(质量浓度为50 μg/mL)为阳性对照,以乳酸为有机酸对照。

1.6 过氧化氢酶和蛋白酶敏感性试验

将过氧化氢酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶分别溶于50 mmol/L磷酸盐缓冲液(PBS)中制成母液,上清液调节至各酶最适反应pH,之后与母液混合,使酶的最终质量浓度为1 mg/mL,37 ℃水浴2 h后测定样品抑菌能力。

1.7 LC-MS/MS检测细菌素

使用相对分子质量3 000超滤管对发酵上清液进行分离,然后进行聚丙烯凝胶电泳。对胶粒进行脱色、脱水、还原烷基化,酶切后将肽段脱盐,进行LC-MS/MS检测。LC-MS/MS采用C_{18}反相高效液相色谱柱(150 μm×150 mm×3 μm),流动相A为体积分数0.1%的甲酸,流动相B为体积分数0.1%甲酸和体积分数80%乙腈的混合液,流量为600 nL/min,质谱激活类型为HCD,喷雾电压为2.2 kV,毛细管温度为270 ℃。

1.8 动物试验设计

选取5周龄雄性C57BL/6J小鼠,饲养在12 h光暗循环的恒温恒湿环境中(温度为20~26 ℃,相对湿度为40%~70%),饲养期间小鼠自由饮食饮水,每隔3 d称量小鼠体质量、摄食量及饮水量。适应期后随机分为4组,每组8只,分别为空白组、FNMGHLBE6L1组、FNMGHLBE20L5组、FHNFQ16L5组。在为期3周的实验中,每只小鼠每日灌胃体积为200 μL,空白组小鼠灌胃生理盐水,实验组灌胃5×10^9 CFU/mL菌悬液。试验方案经江南大学实验动物伦理委员会批准,伦理编号为JN.No20220615c1200831[205]。

1.9 小鼠肠道菌群的测定

在实验第21天收集小鼠粪便,利用粪便DNA快速提取试剂盒提取肠道菌群DNA,参考陈洋的方法进行16S rDNA测序及分析[14]。α多样性和β多样性在https://www.microbiomeanalyst.ca/网站进行分析。

1.10 小鼠血清生化指标的测定

用体积分数3%异氟烷麻醉,采血取样,静置2 h后于3 000 *g*离心15 min,取血清,采用全自动生化分析仪测定血清中TG、TC、HDL-C、LDL-C浓度。

1.11 结肠中细胞因子的测定

将结肠组织按质量体积比1 g:9 mL与PBS混合,匀浆后在4 ℃下于4 000 *g*离心15 min,取上清液。IL-10、IL-6、IL-17、IL-1β、TNF-α质量分数按试剂盒说明进行测定,结果用蛋白质质量浓度进行校准。

1.12 数据处理及分析

试验数据采用平均值±标准差(Mean±SEM)表示,数据使用SPSS 26等软件进行分析;显著性差异采用单因素方差分析中的邓肯检验方法,$P<0.05$为显著性差异。

2 结果与分析

2.1 格氏乳杆菌基因组中的细菌素操纵子

通过BAGEL4对3株格氏乳杆菌潜在的细菌素进行预测。3株格氏乳杆菌的细菌素操纵子不完全相同,但都有瑞士乳杆菌素J;FNMGHLBE20L5、FHNFQ16L5均含有细菌素LS2chainb,见表1。由于3株格氏乳杆菌细菌素操纵子的多样性,推测这3株格氏乳杆菌可能产生不同细菌素。

表1 格氏乳杆菌细菌素操纵子预测

Table 1 Bacteriocin operon prediction of *Lactobacillus gasseri*

菌株	细菌素操纵子
FNMGHLBE6L1	瑞士乳杆菌素J
FNMGHLBE20L5	瑞士乳杆菌素J 细菌素LS2chainb Lactocillin
FHNFQ16L5	瑞士乳杆菌素J 细菌素LS2chainb 格氏乳杆菌素T Acidocin B

2.2 格氏乳杆菌的抑菌能力

根据预测的细菌素的抑菌谱,选取金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*,*S. aureus*)、产肠毒素大肠杆菌(Enterotoxigenic *Escherichia coli*,ETEC)、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*,*L.monocytogenes*)、小肠结肠炎耶尔森菌(*Yersinia enterocolitica*,*Y.enterocolitica*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*,*S.typhimurium*)、肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*,*S.enteritidis*)等6种常见食源性致病菌作为指示菌,分别测定3株格氏乳杆菌的抑菌谱。乳杆菌产生的有机酸主要为乳酸,为

排除有机酸的影响,以乳酸(pH 3)为对照。乳酸对所有指示菌均无抑制作用,FNMGHLBE6L1 对除 ETEC外的其余 5 种指示菌均具有抑制作用,FNMGHLBE20L5 对 *S. aureus*、*Y. enterocolitica*、*S. enteritidis* 具有抑制作用,FHNFQ16L5 仅对 *S. aureus* 表现出抑制作用,见表 2。通过 3 株格氏乳杆菌不同的抑菌谱可以推断,FNMGHLBE6L1、FNMGHLBE20L5、FHNFQ16L5 可产生不同细菌素。

表 2　格氏乳杆菌抑菌谱的测定

Table 2　Antibacterial spectrum of *Lactobacillus gasseri*

样品	抑菌圈直径/mm					
	金黄色葡萄球菌	产肠毒素大肠杆菌	单核细胞增生李斯特菌	小肠结肠炎耶尔森菌	鼠伤寒沙门氏菌	肠炎沙门氏菌
FNMGHLBE6L1	22.7±0.2	—	9.7±1.6	9.8±0.7	19.3±1.4	16.8±0.2
FNMGHLBE20L5	20.3±2.1	—	—	9.6±1.0	—	9.8±1.5
FHNFQ16L5	20.8±0.4	—	—	—	—	—
乳酸	—	—	—	—	—	—

注:—表示无抑菌作用。

2.3　格氏乳杆菌所产的抑菌物质

过氧化氢酶处理对 3 株格氏乳杆菌的抑菌效果影响不大，且乳酸对指示菌均无抑制作用。FNMGHLBE6L1 和 FNMGHLBE20L5 的发酵上清液经胃蛋白酶处理后基本丧失抑菌作用;FHNFQ16L5 发酵上清液经胰蛋白酶处理后基本丧失抑菌作用,见表 3。综上,过氧化氢及有机酸并不是发挥抑菌作用的主要物质，而主要抑菌物质对蛋白酶较为敏感，故蛋白质或多肽类抑菌物质发挥主要抑菌作用。因此,3 株格氏乳杆菌发挥抑菌作用的物质主要为细菌素,且抑菌谱之间的差异证明其可产生不同细菌素。

表 3　过氧化氢酶与蛋白酶对发酵上清液抑菌效果的影响

Table 3　Effects of proteases and catalase on the antibacterial effect of supernatant

菌株	抑菌圈直径/mm		
	过氧化氢酶	胃蛋白酶	胰蛋白酶
FNMGHLBE6L1	10.9±0.4	10.5±0.2	—
FNMGHLBE20L5	10.2±0.2	11.7±0.1	—
FHNFQ16L5	12.0±0.5	—	11.5±0.5

注:—表示无抑菌作用;指示菌为金黄色葡萄球菌。

2.4　格氏乳杆菌所产的细菌素

通过 LC-MS/MS 分析发现,FNMGHLBE6L1 可产生格氏乳杆菌素 K7B、细菌素 LS2、Acidocin B、瑞士乳杆菌素 J;FNMGHLBE20L5 可产生细菌素 LS2、格氏乳杆菌素 K7B、Acidocin B;FHNFQ16L5 可产生格氏乳杆菌素 K7B。BAGEL4 数据库是根据已有研究建立的,其所预测的细菌素均是已发现的[15],但由于菌株的多样性，仍存在多种细菌素未被发现,故可能存在未被发现的细菌素导致抑菌谱与 LC-MS/MS 结果差异。此外,不同细菌素含量的差异也在一定程度上影响了抑菌谱。

2.5　格氏乳杆菌对小鼠生理指标的影响

摄食量、饮水量及体质量可从一定程度上反映小鼠的健康状况。与空白组相比,实验组小鼠的摄食量和饮水量均无显著性差异(P>0.05),见图 1。

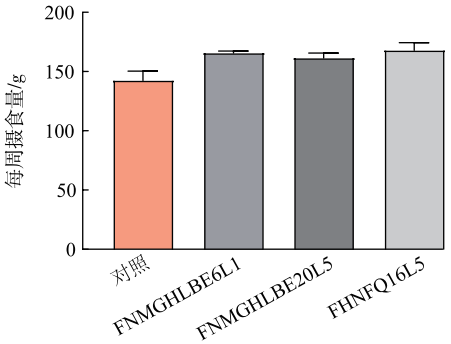
试验期间各组小鼠体质量均逐渐增加,见图 2(a)。相较于空白组,各实验组每日平均体质量变化率略有增加,但无显著性差异(P>0.05),FNMGHLBE6L1 组小鼠体质量增长率比其余两组更高,见图 2(b)。

2.6　格氏乳杆菌对小鼠菌群的影响

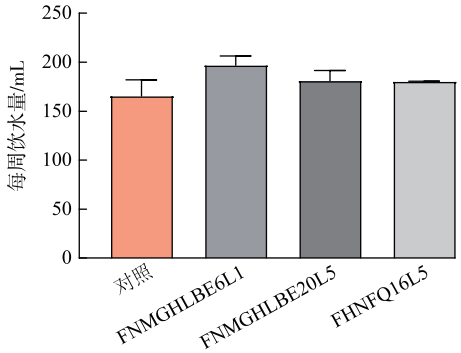
2.6.1　格氏乳杆菌对小鼠肠道菌群 α 多样性的影响

α 多样性可反映小鼠肠道菌群的物种丰富度和均匀度。与空白组相比,实验组 Shannon 指数和 Simpson 指数无显著性差异(P>0.05),但与 FHNFQ16L5 组相比,FNMGHLBE20L5 组显著提高了 Shannon 指数(P<0.05)。与空白组相比,FNMGHLBE6L1 组和 FNMGHLBE20L5 组 Chao1 指数显著升高(P<0.05),FHNFQ16L5 组无显著性差异(P>0.05),见图 3。故灌胃产细菌素的格氏乳杆菌可提高小鼠肠道微生

物的物种数量,但对肠道微生物的均匀度和丰富度均不产生显著影响(P>0.05),且抑菌谱更广的格氏乳杆菌可产生更显著影响(P<0.05)。



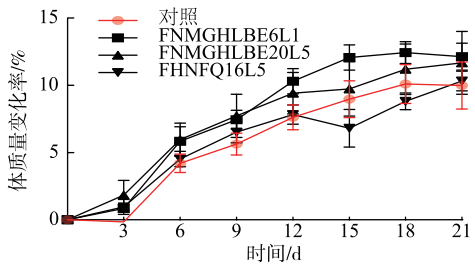
(a)小鼠平均每周摄食量



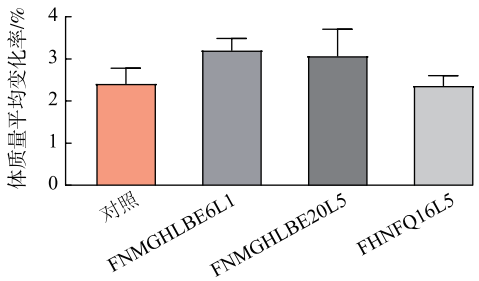
(b)小鼠平均每周饮水量

图 1　小鼠摄食量和饮水量

Fig. 1　Water and food intake of mice



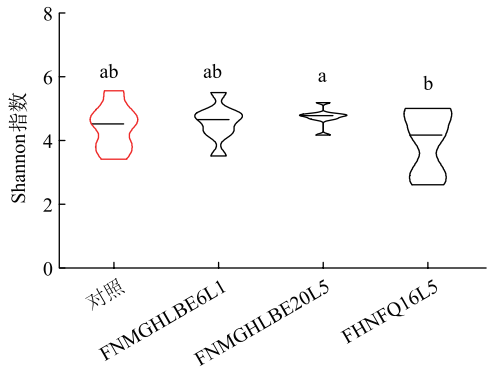
(a)小鼠3周的体质量变化率



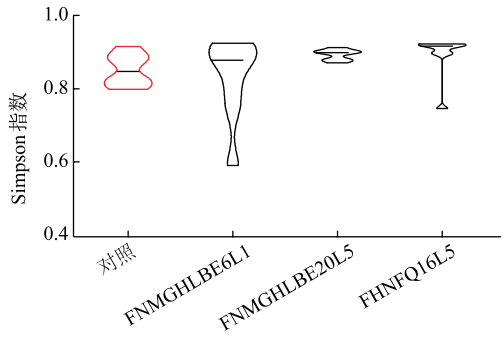
(b)小鼠每天体质量平均变化率

图 2　小鼠体质量变化率

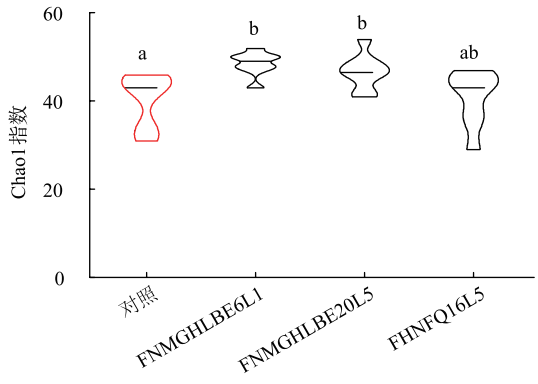
Fig. 2　Rate of weight change of mice



(a)Shannon指数



(b)Simpson指数



(c)Chao1指数

不同字母表示差异显著(P<0.05)。

图 3　产不同细菌素的格氏乳杆菌对小鼠肠道菌群 α 多样性的影响

Fig. 3　Effects on gut microbiota α-diversity in mice of diverse bacteriocins-producing *Lactobacillus gasseri*

2.6.2　格氏乳杆菌对小鼠肠道菌群 β 多样性的影响

通过主坐标分析(principal co-ordinates analysis,PCoA)对小鼠肠道菌群 β 多样性进行分析。灌胃格氏乳杆菌可使小鼠肠道菌群结构产生较大变化,且各实验组间也表现出差异,其中 FNMGHLBE20L5 组更趋向于空白组,FNMGHLBE6L1 组和 FHNFQ16L5 组更为接近,表明产不同细菌素的格氏乳杆菌可对

小鼠肠道菌群产生不同影响,见图 4。研究表明,细菌素很大程度上决定了其产生菌对肠道菌群的影响[16],因此,推测格氏乳杆菌产不同细菌素导致其对小鼠肠道菌群影响存在显著性差异(P<0.001)。

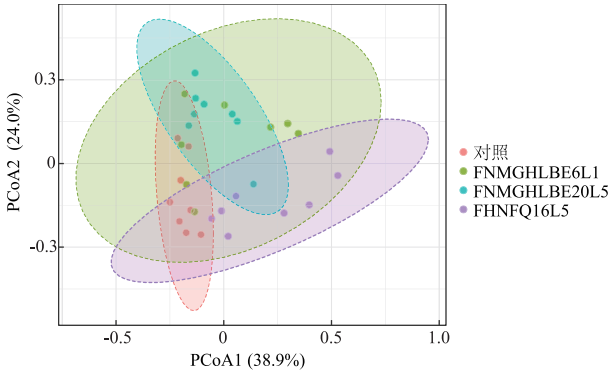


图 4 产不同细菌素的格氏乳杆菌对小鼠肠道菌群 β 多样性的影响

Fig. 4 Effects of diverse bacteriocins-producing *Lactobacillus gasseri* on β-diversity in mice

2.6.3 格氏乳杆菌对小鼠肠道菌群物种组成与差异性分析 利用 STMAP 统计分析表征产不同细菌素的格氏乳杆菌对小鼠肠道菌群属水平调节的差异。相比空白组,FNMGHLBE6L1 显著上调了 *Staphylococcus*、*Intestinimonas* 和 *Acetatifactor* 菌属的水平,显著下调了 *Lactobacillus*、*Roseburia* 和 *Ruminococcaceae* UCG-010 菌属水平(P<0.05),见图 5 (a)。FNMGHLBE20L5 显著上调了*Marvinbryantia*、*Lachnospiraceae*_NK4A136_ group、*Acetatifactor* 和 *Alistipes* 菌属水平,显著下调了 *Lactobacillus*、*Clostridiumsensustricto* 1、*Lachnospiraceae* UCG-006 和 *Ruminococcaceae* UCG-010 菌属水平(P<0.05),见图 5 (b);FHNFQ16L5 显著上调了 *Staphylococcus*、*Alistipes*、*Faecalibaculum*、*Enterorhabdus*、*Marvinbryantia* 和 *Intestinimonas* 菌属水平,显著下调了 *Lachnospiraceae*_NK4A136_group、*Parabacteroides*、*Clostridiumsensustricto* 1、*Bacteriodes*、*Lachnospiraceae* UCG-006 和 *Eubacterium brachy* group 菌属水平(P<0.05),见图 5(c)和图 5(d)。*Staphylococcus* 多数为非致病菌,仅有少数为条件致病菌如 *S. aureus*,常见于皮肤感染及医院感染等。FNMGHLBE6L1 和 FHNFQ16L5 组中*Staphylococcus* 丰度上调,可能是由于其对 *S. aureus* 的抑制能力,从而使得 *Staphylococcus* 属中的其他菌株丰度上调。细菌素对近亲种属的部分菌株具有抑制作用,FNMGHLBE6L1 和 FNMGHLBE20L5 所产生的细菌素可能对 *Lactobacillus* 部分菌株具有抑制作用,从而使得 *Lactobacillus* 丰度下降。研究发现肥胖患者菌群中 *Oscillibacter*、*Intestinimonas* 和 *Alistipes* 菌属丰度显著降低[17]。研究者发现 *Marvinbryantia* 的丰度上调与胰岛素抵抗降低等症状相关[18]。D′amato 等发现移植老年小鼠的肠道菌群可使 *Faecalibaculum* 等菌属丰度降低,这些菌属均与短链脂肪酸的产生相关[19]。Hu 等发现硝酸盐可缓解葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎,在硝酸盐处理组中,*Lachnospiraceae* UCG-006 出现显著上调[20]。作为宿主肠道内醋酸的重要生产者,研究发现 *Alistipes* 在非酒精性脂肪肝患者中显著减少[21]。*Lachnospiraceae*_NK4A136_ group 是与肥胖相关的潜在有益菌属,与肥胖呈负相关性[22]。此外,*Lachnospiraceae*_NK4A136_ group 表现出抗炎性,有助于肠道黏膜修复[23]。产细菌素的乳酸菌可使脂肪细胞减小,增加与脂肪酸氧化相关基因的表达[24],且 3 株格氏乳杆菌影响的菌属也多与肥胖相关。此外,部分差异菌属与短链脂肪酸的产生相关,短链脂肪酸是格氏乳杆菌除细菌素外的另一种重要代谢产物,可进一步对小鼠短链脂肪酸的含量进行测定,以期发现细菌素与短链脂肪酸含量的相关性。

2.7 格氏乳杆菌对小鼠结肠细胞因子水平的调节

格氏乳杆菌可影响宿主的系统免疫和黏膜免疫,即影响肠道免疫相关的细胞因子。与空白组相比,格氏乳杆菌对 IL-6、IL-17、TNF-α 以及 IL-10 均无显著影响(P>0.05),见图 6(a)~(d),但均显著降低了结肠中IL-1β 的水平(P<0.05),见图 6(e)。研究发现,Nisin 可刺激外周血白细胞产生 IL-1β 和 IL-6,提高 $CD4^+CD8^+$T 细胞的比例[25]。此外,植物乳杆菌产生的细菌素可能以类似于胃肠道分泌的抗菌肽的方式来调节免疫[26-27]。产细菌素的格氏乳杆菌显著下调了 IL-1β 的蛋白质水平(P<0.05),相比于 FNMGHLBE20L5 组,FHNFQ16L5 组显著提高了 IL-10 的蛋白质水平(P<0.05),可能是由于两者所产细菌素的差异直接或间接影响了 IL-10,也可能与炎症相关菌属受到格氏乳杆菌的调节有关。

2.8 格氏乳杆菌对小鼠血脂代谢的影响

实验组小鼠体质量与空白组相比出现上调现象,故对小鼠血清中 HDL-C、LDL-C、TC、TG 进行检

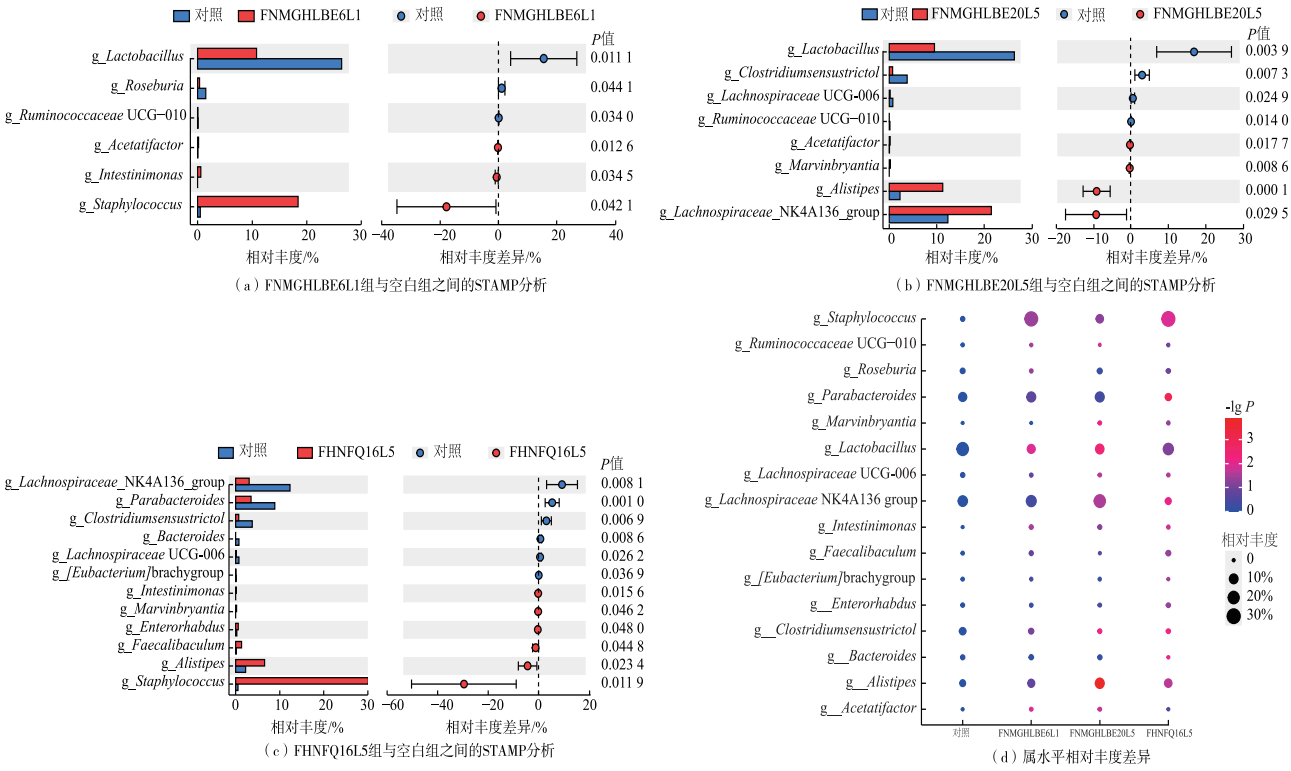


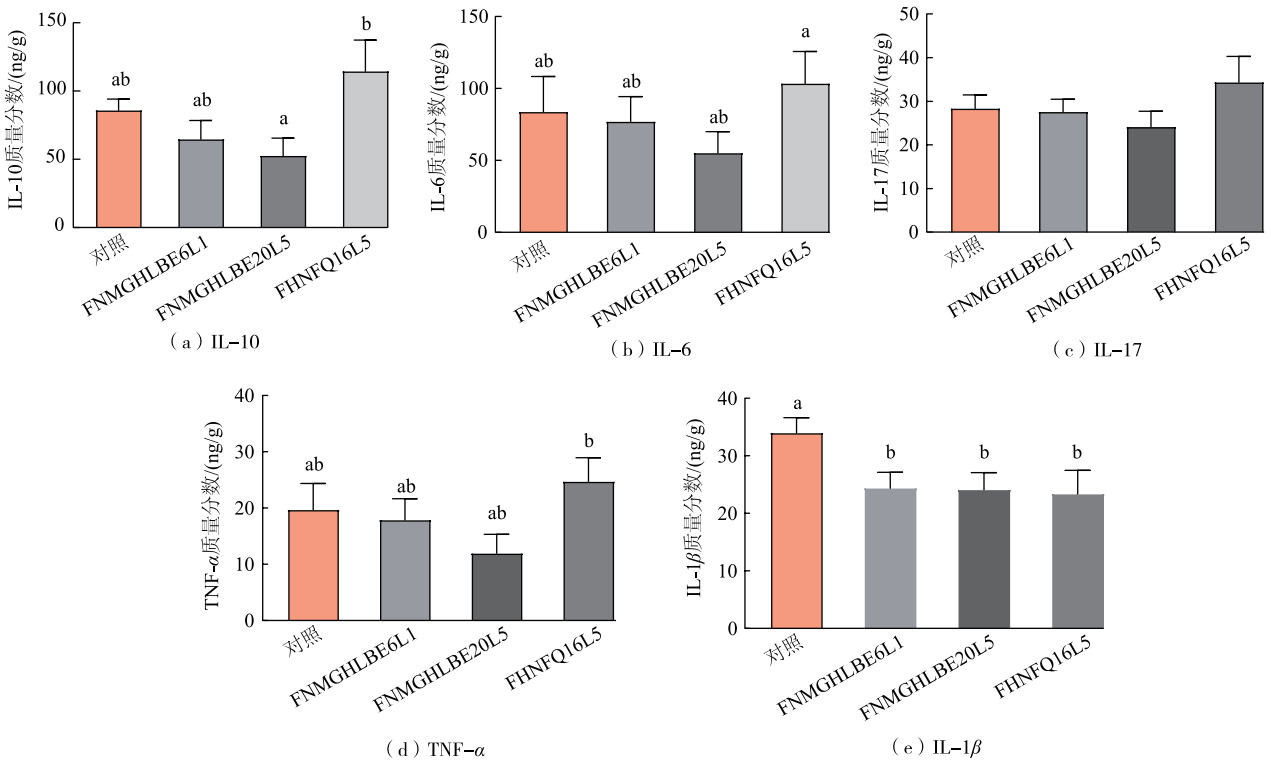
图 5　产不同细菌素的格氏乳杆菌对小鼠肠道菌群属水平的影响

Fig. 5　Effects of diverse bacteriocins-producing *Lactobacillus gasseri* on genus-level in gut microbiota

测。与空白组相比,FNMGHLBE6L1 组和 FNMGHLBE20L5 组血清中 LDL-C 水平略有上调,但 HDL-C、LDL-C、TC、TG 水平均无显著差异(P>0.05),见图 7。TC、TG 等指标与肥胖等代谢疾病密切相关,研究表明产细菌素的乳酸菌可通过宿主肠道菌群影响宿主体质量[7]。与空白组相比,实验组差异菌属多与肥胖相关(P<0.05),但格氏乳杆菌未对 TC 等指标产生影响,这可能是由于细菌素抑菌作用的特异性,其对健康宿主无不良影响。

2.9　格氏乳杆菌抑菌谱与差异菌属的相关性分析

由于格氏乳杆菌可能产生未知细菌素,故对格氏乳杆菌的抑菌谱及差异菌属进行相关性分析,见图 8。格氏乳杆菌所产细菌素可对宿主的肠道菌群的多样性和结构产生显著影响(P<0.05)。格氏乳杆菌对 *S. aureus* 的抑制性与 *Lactobacillus*、*Roseburia*、*Clostridiumsensustricto* 1、*Lachnospiraceae* UCG-006、*Ruminococcaceae* UCG-010 显著负相关,与 *Alistipes*、*Staphylococcus*、*Intestinimonas* 显著正相关;对 *L. monocytogenes* 的抑制性与 *Marvinbryantia*、*Roseburia* 显著负相关,与 *Intestinimonas* 显著正相关;对 *Y. enterocolitica* 的抑制性与 *Lactobacillus*、*Ruminococcaceae* UCG-010、*Enterorhabdus* 显著负相关,与 *Acetatifactor*、*Intestinimona*、*Parabacteroides*、*Lachnospiraceae*_NK4A136_group 显著正相关;对 *S. typhimurium* 的抑制性与 *Roseburia*、*Marvinbryantia* 显著负相关,与 *Intestinimonas* 显著正相关;对 *S. enteritidis* 的抑制性与*Ruminococcaceae* UCG-010、*Lactobacillus*、*Enterorhabdus* 显著负相关,与 *Intestinimonas*、*Lachnospiraceae*_NK4A136_group、*Acetatifactor*、*Parabacteroides* 显著正相关(P<0.05)。FNMGHLBE20L5 组中 *Marvinbryantia* 丰度上调,但 *Marvinbryantia* 与格氏乳杆菌对 *L. monocytogenes*、*S. typhimurium* 的抑制能力负相关,可能是由于 FNMGHLBE20L5 对这两种指示菌不具有抑制性,对 *S. aureus* 具有较强的抑制能力,而对 *S. aureus* 抑制性与 *Marvinbryantia* 正相关,故 FNMGHLBE20L5 组出现 *Marvinbryantia* 上调的现象,且对同一菌属表现出不同相关性时,菌属水平与其抑制作用的强弱相关。肠道菌群是一个复杂的结构,格氏乳杆菌对一种致病菌的抑制能力与多种肠道菌属具有相



不同字母表示显著差异(P<0.05)。

图 6　产不同细菌素的格氏乳杆菌对小鼠结肠组织细胞因子浓度的影响

Fig. 6　Effects of diverse bacteriocins-producing *Lactobacillus gasseri* on cytokine concentrations in colon

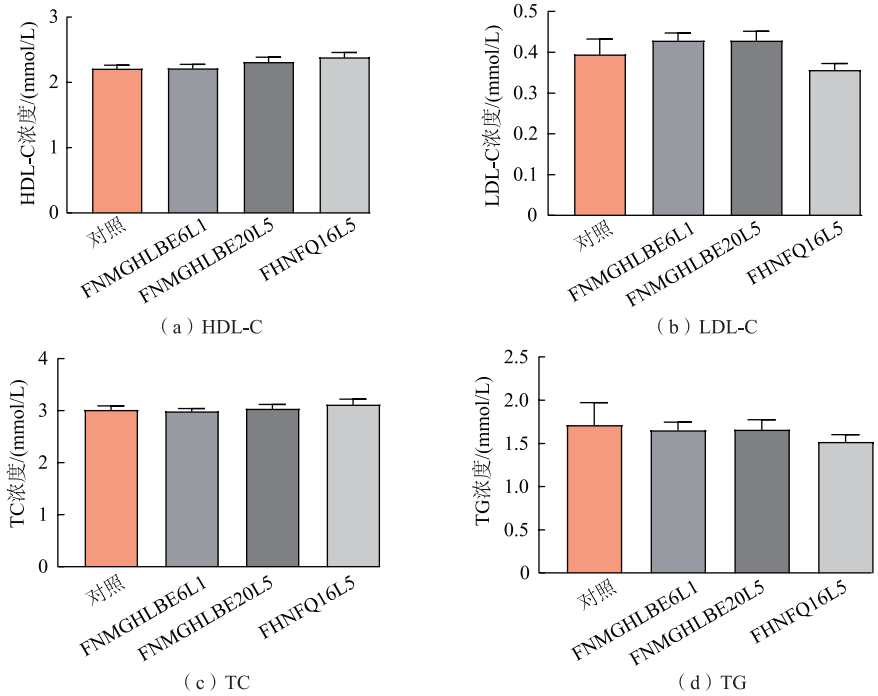
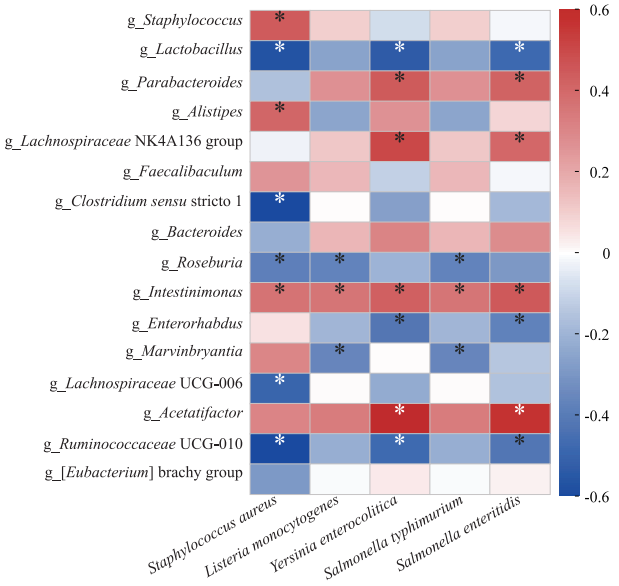


图 7　产不同细菌素的格氏乳杆菌对小鼠血脂代谢的影响

Fig. 7　Effects of diverse bacteriocins-producing *Lactobacillus gasseri* on lipid metabolism of mice

关性,且不同细菌素对菌群的作用靶点不同。因此,可产不同细菌素的格氏乳杆菌对宿主肠道菌群影响的差异与其产生的细菌素相关。



* 表示 $P<0.05$。

图 8　格氏乳杆菌的抑菌谱与差异菌属的相关性分析

Fig. 8　Correlation analysis between antibacterial spectrum and different genus

3 结　语

本研究中 3 株格氏乳杆菌在抑菌试验中表现出 3 种不同的抑菌谱,且经 LC-MS/MS 证实 3 株格氏乳杆菌可产生不同细菌素。在动物试验中,3 株格氏乳杆菌均对小鼠肠道菌群多样性及菌群结构产生了显著影响。从本研究结果可发现,产不同细菌素的格氏乳杆菌对肠道菌群的影响有规律性,如产 Acidocin B 和格氏乳杆菌素 K7B 的FNMGHLBE6L1 和 FNMGHLBE20L5 均可使 *Acetatifactor* 水平显著上调、*Lactobacillus* 和 *Ruminococcaceae* UCG-010 水平显著下调 ($P<0.05$),不产生这两种细菌素的 FHNFQ16L5 对以上菌属无显著影响($P>0.05$),这表明 Acidocin B 和格氏乳杆菌素 K7 可对宿主肠道菌群中 *Acetatifactor*、*Lactobacillus* 和 *Ruminococcaceae* UCG-010 产生影响,但还需对不同细菌素影响的具体菌属进一步探究。除菌群外,格氏乳杆菌显著影响了宿主结肠 IL-1β、IL-10 的水平,故产细菌素的格氏乳杆菌可直接或间接通过调节肠道菌群影响宿主免疫。该研究为探究产不同细菌素的格氏乳杆菌对肠道菌群的影响及机制提供了参考,同时为细菌素产生菌调节宿主肠道微生态提供了理论依据。

参考文献:

[1] SELLE K, KLAENHAMMER T R. Genomic and phenotypic evidence for probiotic influences of *Lactobacillus gasseri* on human health[J]. **FEMS Microbiology Reviews**, 2013, 37(6): 915-935.

[2] OLIVARES M, DÍAZ-ROPERO M A, GÓMEZ N, et al. Oral administration of two probiotic strains, *Lactobacillus gasseri* CECT5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT5711, enhances the intestinal function of healthy adults[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2006, 107(2): 104-111.

[3] LARA-VILLOSLADA F, SIERRA S, BOZA J, et al. Beneficial effects of consumption of a dairy product containing two probiotic strains, *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 and *Lactobacillus gasseri* CECT5714 in healthy children[J]. **Nutricion Hospitalaria**, 2007, 22(4): 496-502.

[4] ZHU W M, LIU W, WU D Q. Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* KT7[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2000, 88(5): 877-886.

[5] 宋刚,曹春振,杨志馨,等. 群体感应调控下的乳酸菌细菌素合成[J]. 食品与生物技术学报,2020,39(11):12-17.
SONG G, CAO C Z, YANG Z X, et al. Bacteriocin synthesis of lactic acid bacteria under quorum sensing[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2020, 39(11): 12-17. (in Chinese)

[6] DOBSON A, COTTER P D, ROSS R P, et al. Bacteriocin production: a probiotic trait?[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2012, 78(1): 1-6.

[7] ANGELAKIS E, MERHEJ V, RAOULT D. Related actions of probiotics and antibiotics on gut microbiota and weight modification[J]. **The Lancet Infectious Diseases**, 2013, 13(10): 889-899.

[8] BARTOSCH S, FITE A, MACFARLANE G T, et al. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota[J].

Applied and Environmental Microbiology,2004,70(6):3575-3581.

[9] KAWAI Y,SAITO T,TOBA T,et al. Isolation and characterization of a highly hydrophobic new bacteriocin (gassericin A) from *Lactobacillus gasseri* LA39[J]. **Bioscience,Biotechnology,and Biochemistry**,1994,58(7):1218-1221.

[10] KAWAI Y,SAITOH B,TAKAHASHI O,et al. Primary amino acid and DNA sequences of gassericin T,a lactacin F-family bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* SBT2055[J]. **Bioscience,Biotechnology,and Biochemistry**,2000,64(10):2201-2208.

[11] BOGOVIC-MATIJASIC B,ROGELJ I,NES I F,et al. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,1998,49(5):606-612.

[12] XIANG S S,FU J,YE K,et al. Effect of *Lactobacillus gasseri* PA3 on gut microbiota in an *in vitro* colonic simulation[J]. **Food Science & Nutrition**,2019,7(12):3883-3891.

[13] 岳月. 不同乳杆菌对产肠毒素大肠杆菌所导致的腹泻的缓解作用及机制研究[D]. 无锡:江南大学,2021.

[14] 陈洋. 产共轭亚油酸双歧杆菌对结肠炎的缓解作用及机制研究[D]. 无锡:江南大学,2021.

[15] VAN HEEL A J,JONG A D,SONG C X,et al. BAGEL4:a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins [J]. **Nucleic Acids Research**,2018,46(W1):W278-W281.

[16] RIBOULET-BISSON E,STURME M H,JEFFERY I B,et al. Effect of *Lactobacillus salivarius* bacteriocin Abp118 on the mouse and pig intestinal microbiota[J]. **PLoS One**,2012,7(2):e31113.

[17] THINGHOLM L B,RÜHLEMANN M C,KOCH M,et al. Obese individuals with and without type 2 diabetes show different gut microbial functional capacity and composition[J]. **Cell Host & Microbe**,2019,26(2):252-264.

[18] CHEN Z L,RADJABZADEH D,CHEN L M,et al. Association of insulin resistance and type 2 diabetes with gut microbial diversity:a microbiome-wide analysis from population studies[J]. **JAMA Network Open**,2021,4(7):e2118811.

[19] D'AMATO A,DI CESARE M L,LUCARINI E,et al. Faecal microbiota transplant from aged donor mice affects spatial learning and memory via modulating hippocampal synaptic plasticity- and neurotransmission-related proteins in young recipients [J]. **Microbiome**,2020,8(1):140.

[20] HU L,JIN L Y,XIA D S,et al. Nitrate ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis by regulating the homeostasis of the intestinal microbiota[J]. **Free Radical Biology & Medicine**,2020,152:609-621.

[21] PARKER B J,WEARSCH P A,VELOO A C M,et al. The genus *Alistipes*:gut bacteria with emerging implications to inflammation,cancer,and mental health[J]. **Frontiers in Immunology**,2020,11:906.

[22] WANG B X,YU H S,HE Y,et al. Effect of soybean insoluble dietary fiber on prevention of obesity in high-fat diet fed mice via regulation of the gut microbiota[J]. **Food & Function**,2021,12(17):7923-7937.

[23] LI A L,NI W W,ZHANG Q M,et al. Effect of cinnamon essential oil on gut microbiota in the mouse model of dextran sodium sulfate-induced colitis[J]. **Microbiology and Immunology**,2020,64(1):23-32.

[24] ANJANA,TIWARI S K. Bacteriocin-producing probiotic lactic acid bacteria in controlling dysbiosis of the gut microbiota [J]. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**,2022,12:851140.

[25] MAŁACZEWSKA J,KACZOREK-ŁUKOWSKA E,WÓJCIK R,et al. *In vitro* immunomodulatory effect of nisin on porcine leucocytes[J]. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**,2019,103(3):882-893.

[26] VAN HEMERT S,MEIJERINK M,MOLENAAR D,et al. Identification of *Lactobacillus plantarum* genes modulating the cytokine response of human peripheral blood mononuclear cells[J]. **BMC Microbiology**,2010,10:293.

[27] MEIJERINK M,VAN HEMERT S,TAVERNE N,et al. Identification of genetic loci in *Lactobacillus plantarum* that modulate the immune response of dendritic cells using comparative genome hybridization[J]. **PLoS One**,2010,5(5):e10632.

(责任编辑:李春丽)