DOI:10.12441/spyswjs.20250122002 [文章编号] 1673-1689(2025)04-0042-11

复合益生菌改善小鼠H1N1流感症状及对肠道菌群和代谢物的影响

喻喜华[1,2] 王 一[1,2] 李刘若兰[1,2] 赵羽豪[3] 王鸿超[3*]

(1. 国药控股星鲨制药(厦门)有限公司,福建 厦门 361026; 2. 厦门市母婴健康营养产品重点实验室,福建 厦门 361026; 3. 江南大学食品学院,江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】探究复合益生菌在甲型H1N1流感小鼠模型中的缓解效果及其对肠道菌群及代谢物的影响。**【方法】**以具有缓解呼吸道感染能力的*Lacticaseibacillus rhamnosus* CCFM1279为主,结合*Limosilactobacillus reuteri* CCFM1145、*Lacticaseibacillus casei* CCFM1127和多种膳食因子,将3~4周龄SPF级ICR小鼠随机分成4组:空白组、模型组、阳性药物(奥司他韦)组、复合益生菌组,通过鼻滴感染H1N1流感病毒的方式来构建小鼠流感模型。以体质量变化率、病毒载量、肺泡灌洗液中*L*-乳酸脱氢酶活性等为指标分析复合益生菌缓解甲型H1N1流感症状的能力。采用16S rRNA基因测序评估肠道菌群的变化。采用非靶向代谢组学分析肠道代谢物的变化。**【结果】**口服复合益生菌可有效抵抗甲型H1N1流感,其作用机制在于抑制病毒复制,并减轻肺部炎症损伤,降低肺泡灌洗液中*L*-乳酸脱氢酶活性。此外,复合益生菌能够调节宿主血清中IL-6、TNF-α质量浓度以及肺部抗病毒蛋白OAS1的相对表达量。复合益生菌显著增加了*Parabacteroides*的相对丰度。代谢物分析显示,复合益生菌显著提高了丙酮酸等代谢物的相对丰度。**【结论】**甲型H1N1流感小鼠口服复合益生菌后,能够有效抵抗甲型H1N1病毒,并且可能通过特定肠道菌群及代谢物在缓解流感进程中发挥作用,为通过肠道菌群来防治流感的研究提供更多思路。

关键词:流感病毒;肠道菌群;抗病毒益生菌;系统性免疫;膳食因子;非靶向代谢组学;乳酪杆菌

A Probiotic Formula for Alleviation of H1N1 Infection in Mice and Its Effects on the Gut Microbiota and Metabolites

YU Xihua[1,2] *WANG Yi*[1,2] *LI Liuruolan*[1,2] *ZHAO Yuhao*[3] *WANG Hongchao*[3*]

(1. Sinopharm Xingsha Pharmaceuticals (Xiamen) Co., Ltd., Xiamen 361026, China; 2. Xiamen Key Laboratory of Maternal and Infant Health and Nutrition Products, Xiamen 361026, China; 3. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to explore the alleviating effect of a probiotic formula on H1N1 infection in mice and the effects of this formula on the gut microbiota and metabolites. [**Method**] *Lactobacillus rhamnosus* CCFM1279 with the ability to alleviate respiratory tract infections was combined with *Limosilactobacillus reuteri* CCFM1145, *Lacticaseibacillus casei* CCFM1127, and various dietary factors to prepare a probiotic formula. SPF-grade ICR mice of 3 to 4 weeks old were randomized into blank, model, positive control (oseltamivir), and probiotic formula groups. A mouse model of influenza was constructed by nasal inhalation with the H1N1 virus. The alleviating effect of the probiotic formula on H1N1 infection was evaluated based on indicators such as body

基金项目:国家“十四五”重点研发计划项目(2022YFF1100403)。

通信作者:王鸿超(1985—),男,博士,副研究员,硕士研究生导师,主要从事肠道菌群与精准营养研究。Email:hcwang@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2025-01-22 **修回日期:**2025-02-15

mass change rate, virus load, and *L*-lactate dehydrogenase activity in the bronchoalveolar lavage fluid. The 16S rRNA gene sequencing was employed to evaluate changes in the gut microbiota. Non-targeted metabolomics was employed to analyze changes in gut metabolites. [**Result**] Oral administration of the probiotic formula effectively resisted H1N1 influenza by inhibiting virus replication, alleviating lung inflammation and damage, and reducing the *L*-lactate dehydrogenase activity in the bronchoalveolar lavage fluid. In addition, the probiotic formula regulated the mass concentrations of IL-6 and TNF-α in the host serum and the relative expression level of the antiviral protein OAS1 in the lung tissue. It significantly increased the abundance of *Parabacteroids*. Metabolite analysis showed that the probiotic formula significantly increased the relative abundance of metabolites such as pyruvic acid. [**Conclusion**] Oral administration of the probiotic formula can effectively resist the H1N1 virus in the mouse model of H1N1 infection. The probiotic formula may play a role in alleviating influenza progression by specifically regulating the gut microbiota and metabolites. The findings provide new research ideas for the prevention and treatment of influenza *via* the gut microbiota.

Keywords: influenza virus; gut microbiota; antiviral probiotics; systemic immunity; dietary factors; non-targeted metabolomics; *Lacticaseibacillus*

流感是一种常见且具有广泛传播性的呼吸道疾病，不仅会引起肺部炎症[1-2]，同时也会引起一定程度的肠道损伤[3]，其危害不容小觑。每年流感病毒席卷全球都会给人类健康和社会经济带来巨大负担[4]。尽管接种疫苗已经作为最有效的预防手段广泛实施，但目前的疫苗系统不能灵活快速地应对流感病毒的挑战[5]。研究表明，流感疫苗会降低机体对流感病毒的免疫响应且增加不良反应的发生率[6]，甚至对幼儿缺乏有效性[7]。

肠道环境在调节免疫系统功能中起着至关重要的作用。大量数据表明，来自肠道的菌群及代谢物与肺部之间具有密切联系[8]，肠道中短链脂肪酸水平的升高可以促进肺部树突状细胞前体增加，有助于肺部免疫环境的塑造[9]。此外，由免疫球蛋白A（IgA）、黏膜内淋巴细胞和肠系膜淋巴结等组成的肠道免疫屏障也是抵抗外源病原体的重要防线[10]。因此，研究人员开始关注肠-肺轴的作用，即肠道与肺部之间的相互影响。肠道菌群作为肠道内的微生物群落，在维持机体免疫稳态中发挥着重要作用[11-12]。越来越多的证据表明，肠道菌群与呼吸道健康联系密切，肠道菌群失衡可能通过影响免疫系统，进而增加患流感等呼吸道疾病的风险[13]。

尽管研究发现，特定益生菌可以通过肠道菌群来影响免疫系统的调节，进而调节呼吸道的免疫应答或提高疫苗的保护率，来保护机体免受流感病毒的侵害[14-16]，但益生菌尚未在流感的防治中得到广泛应用。随着全球寻找更强效菌株的竞争日益激烈，有必要通过体内研究来验证益生菌的效果。作者以筛选出的一株具有抗流感功能的*Lacticaseibacillus rhamnosus* CCFM1279为基础，将一株具有调节机体免疫功能的*Limosilactobacillus reuteri* CCFM1145[17]和一株具有保护肠道屏障功能的*Lacticaseibacillus casei* CCFM1127以及蒲公英粉和金银花粉等膳食因子组成复合益生菌，通过甲型H1N1流感小鼠模型评估其对流感表征指标和免疫系统的影响，并结合多组学技术探究防治流感的潜在靶点和肠-肺轴互作机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Lacticaseibacillus rhamnosus CCFM1279、*Limosilactobacillus reuteri* CCFM1145和*Lacticaseibacillus casei* CCFM1127：江南大学食品微生物保藏中心；蒲公英粉、金银花粉：陕西嘉禾生物科技有限公司；低聚果糖：量子高科（中国）生物股份有限公司；低聚木糖、微粉木糖醇：山东龙力生物科技股份有限公司；复合莓粉、接骨木莓果汁粉：拓丰粉体（昆山）有限公司；抗性糊精：ADM艾地盟松谷（上海）食品有限公司；乳糖醇：山东绿健生物技术有限公司；大米粉：北京朔方科技发展股份有限公司；亚麻籽甘油二酯食用油粉：善百年营养科技股份有限公司。蛋白胨、酵母粉、无水乙酸钠、柠檬酸氢二铵、K_2HPO_4、$MgSO_4$、*L*-半胱氨酸盐酸盐、牛

肉膏、$MnSO_4$：国药集团化学试剂有限公司；奥司他韦：宜昌东阳光长江药业股份有限公司；EDTA-K2抗凝管：无锡恒康医疗科技有限公司；甲醇、乙腈：北京伊诺凯科技有限公司；IL-6、IL-1β、TNF-α酶联免疫反应试剂盒：美国R&D公司；组织总RNA提取试剂（Trizol法）、通用型逆转录酶（HiScript® II Super-Mix）、qPCR反应体系（ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix）、VAHTS Universal DNA Library Prep Kit for Illumina V3高效DNA文库构建试剂盒（ND607）：南京诺唯赞生物科技股份有限公司；粪便提取试剂盒（Fast DNA spin kit）：美国MP Biomedicals公司。

甲型H1N1流感病毒由扬州大学禽流感重点实验室提供。

1.2 仪器与设备

pH计：ST3100型，美国奥豪斯仪器有限公司；涡旋混匀仪：MX-S型，大龙兴创实验仪器（北京）股份公司；厌氧培养箱：Whitley DG250型，英国Don Whitley Scientific公司；恒温生化培养箱：ZXSD-A1019型，上海智城分析仪器制造有限公司；高压蒸汽灭菌锅：SX-300型，日本Tomy公司；高速冷冻离心机：Sorvall ST8R型，美国Thermo Fisher Sciecntific公司；气相色谱-质谱联用仪：Trace 1300型，美国Thermo Fisher Sciecntific公司；半自动酶标仪：Multiskan GO型，美国Thermo Fisher Sciecntific公司；真空冷冻干燥机：SPD131DDA型，美国Thermo Fisher Sciecntific公司；自动血液分析仪：BC-500型，深圳明瑞生物医药电子有限公司；实时荧光定量PCR仪：CFX96 Touch型，美国Bio-Rad Laboratories公司；PCR热循环仪：C1000 Touch型，美国Bio-Rad Laboratories公司；高通量组织研磨器：SCIENTZ-48型，宁波新芝生物科技股份有限公司；微孔板恒温振荡器：MB100-2A型，杭州奥盛仪器有限公司；数字切片扫描仪：PANNORMIC MIDI型，匈牙利3DHistech有限公司；超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪：Waters UPLC-TQD型，美国Waters公司。

1.3 动物试验

40只SPF级ICR小鼠，3~4周龄，雌性，体质量14~15 g：北京维通利华实验动物技术有限公司。动物饲养环境为室温24~26 ℃，相对湿度40%~80%，遵循12 h白昼和12 h黑夜，标准配方商业化饲料喂养，自由进食和饮水。所有动物试验的相关操作均参照欧盟关于动物试验的指导条例（Directive 2010/63/EU）进行。动物试验方案及操作由扬州大学动物伦理委员会批准（批准号：No. 202306835）。

10 d的适应期后，将40只小鼠随机分为空白组、模型组、阳性药物（奥司他韦）组和复合益生菌组（n=10）。从动物试验第10天开始，每天给复合益生菌组的小鼠灌胃200 μL复合益生菌饮料，空白组、模型组、阳性药物组灌胃等量的生理盐水。动物试验第17天，除空白组小鼠外，其余全部小鼠通过吸入乙醚麻醉，保持呼吸道畅通，之后使用微量移液器或滴管将37 μL H1N1流感病毒悬液（1×10^{-5} PFU/mL）滴入小鼠的鼻腔中，确保小鼠将所有病毒悬液全部吸入鼻腔后，将小鼠放置在温暖、干燥的环境中，等待恢复清醒状态，并在1 h内对阳性药物组小鼠灌胃奥司他韦。在流感病毒感染后，复合益生菌组小鼠继续每天灌胃200 μL复合益生菌饮料，空白组、模型组、阳性药物组继续灌胃等量的生理盐水，每天测量小鼠的体质量，直至第22天。

1.4 肺组织细胞损伤测定

对小鼠实施安乐死后，使用800 μL磷酸盐缓冲液进行3次肺泡灌洗，将所有灌洗液提取出来，在4 ℃以1 500 g离心15 min，获得支气管肺泡灌洗液。使用乳酸脱氢酶活性检测试剂盒测定支气管肺泡灌洗液中的L-乳酸脱氢酶活性。

1.5 肺组织病理学损伤检测

在肺泡灌洗后，先将左肺叶保存在福尔马林中，之后用石蜡块包埋，将肺组织切成5 μm厚的切片，并采用苏木精-伊红（HE）染色。使用数字切片扫描仪对组织切片进行拍照。

1.6 抗病毒蛋白的病毒载量定量和mRNA表达分析

将小鼠肺组织放入无酶管，浸入液氮中，随后保存在-80 ℃下。利用Trizol试剂处理肺组织样本以提取总RNA。随后借助HiScript® II Super-Mix将该RNA转化为cDNA。按照制造商提供的指南将cDNA与ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix混合后，使用热循环仪进行qPCR。通过$2^{-\Delta\Delta Ct}$

方法对基因进行定量，用内参基因*GADPH*进行基因表达的归一化处理。所用引物序列见表1。

表1　引物序列

Table 1　Primer sequences

基因	序列（5′—3′）
GAPDH	F：AATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC
	R：GCCTTGACTGTGCCGTTGAA
NP	F：GGCACCAAACGGTCTTACGA
	R：TCACCTGATCAACTCCATTACCA
Oas1	F：GAAGAGGCTGATGTGTGGCT
	R：TGTCCAGTTCTCTTCTACCTGC

1.7　细胞因子定量

血清在−20 ℃下冷冻。使用ELISA试剂盒测定TNF-α、IL-6和IL-1β的水平。

1.8　血常规检测

在室温下，将小鼠血液收集在含有EDTA的抗凝管中，确保与EDTA充分接触。使用自动血液分析仪分析单核细胞、中性粒细胞的数目。

1.9　肠道菌群分析

使用粪便DNA提取试剂盒提取小鼠粪便中的总DNA。使用V3—V4区引物对进行16S rRNA基因的扩增，该引物对包括正向引物341F（序列：5′-CCTAYGGGRBGCASCAG-3′）和反向引物806R（序列：5′-GGACTACNVGGGTATCTAAT-3′）。PCR扩增程序：95 ℃预变性5 min；95 ℃变性30 s，52 ℃退火30 s，72 ℃延伸30 s，30个循环；PCR结束后，在72 ℃最后延伸7 min。然后使用琼脂糖凝胶电泳分离并回收纯化的DNA样本，将纯化的DNA样本送至江南大学使用Illumina MiSeq系统进行测序，测序模式为2×300 bp。然后使用QIIME2软件对测序数据进行质量控制，质量分数阈值设定为q<20。在获得操作分类单元表后，进行群落多样性和组间微生物群落差异分析。

1.10　肠道代谢组分析

采用液相色谱−质谱（LC-MS）技术检查粪便代谢物。首先将20 mg粪便样本与200 μL双蒸水（ddH_2O）充分混合。加入800 μL含有体积分数50%甲醇的乙腈，在−20 ℃孵育1 h，在4 ℃以15 000 g离心15 min沉淀蛋白质。随后将上层液体蒸干。将干燥的样品溶解在200 μL含有体积分数50%甲醇的水溶液中，并在4 ℃以15 000 g离心15 min收集上清液。经过0.22 μm滤膜过滤后，进行LC-MS分析。

1.11　数据分析

使用Origin 2021和IBM SPSS Statistics 26.0软件进行统计分析，数据表示为平均值±标准误差。采用Student's t-test和ANOVA进行差异性分析，P<0.05被认为具有统计学意义。

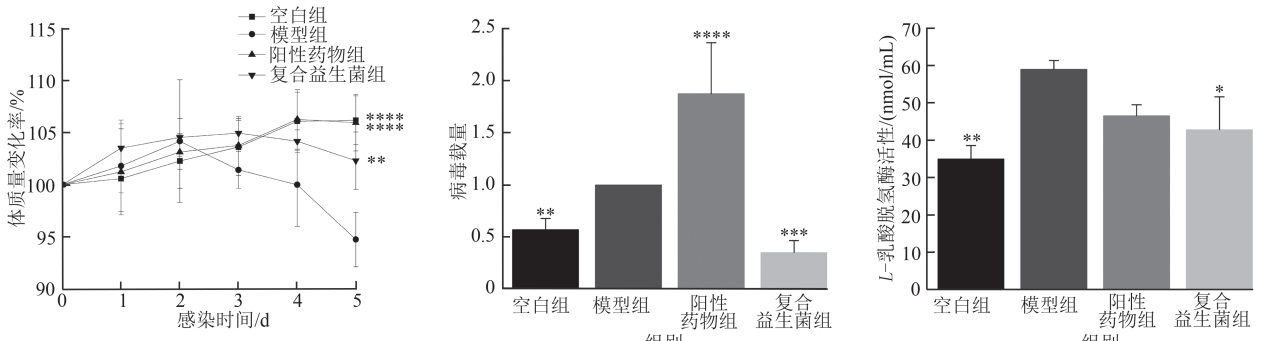
2　结果与讨论

2.1　复合益生菌对甲型H1N1流感小鼠感染症状的影响

小鼠体质量能直观、全面地反映流感的病程。为了探究复合益生菌对流感病毒感染的缓解作用，作者在感染前后持续给小鼠口服复合益生菌。如图1（a）所示，空白组在干预期的体质量呈上升趋势。甲型H1N1病毒感染后的第3天，模型组小鼠体质量开始下降，这一下降趋势一直持续到小鼠死亡。在感染后第5天，模型组小鼠体质量显著下降至空白组的94.93%。复合益生菌组小鼠在感染后期体质量下降明显缓解，表明复合益生菌有效控制了甲型H1N1流感进程。

小鼠肺部流感病毒载量结果显示，复合益生菌能够显著抑制病毒在肺部的复制（P<0.000 1），见图1（b）。此外，空白组小鼠肺部的*L*-乳酸脱氢酶活性较低，表明肺细胞损伤程度较小，肺部完整性较强。与模型组相比，口服复合益生菌明显降低了*L*-乳酸脱氢酶活性，减轻甲型H1N1流感病毒对肺部的破坏，见图1（c）。

肺部病理是评估呼吸道感染程度的重要指标。甲型H1N1流感病毒感染肺部细胞后会激活宿主免疫系统的响应，随着炎症因子的释放，免疫细胞被激活，在感染区域聚集，形成局部炎性细胞浸润，通过这种方式清除甲型H1N1流感病毒，阻止进一步的恶化。如图2所示，空白组可见光滑完整的支气管，并没有表现任何炎症和出血的现象。模型组出现炎性细胞严重浸润及支气管破裂，黏膜不完整，甚至发现局部出血的现象。口服复合益生菌显著缓解了小鼠肺部病理炎症，支气管和血管周围未见炎性细胞浸润，肺泡结构较完整，与空白组水平接近。小鼠肺部损伤和炎症反应得到改善，这与先前研究的结果一致[18]。



与模型组相比，**—P<0.01；****—P<0.000 1。

(a) 甲型H1N1流感病毒感染后小鼠体质量变化率

与模型组相比，**—P<0.01；***—P<0.001；****—P<0.000 1。

(b) 小鼠肺部病毒载量

与模型组相比，*—P<0.05；**—P<0.01。

(c) 小鼠肺泡灌洗液中L-乳酸脱氢酶活性

图 1　复合益生菌对小鼠流感症状的影响

Fig. 1　Effects of the probiotic formula on influenza symptoms in mice

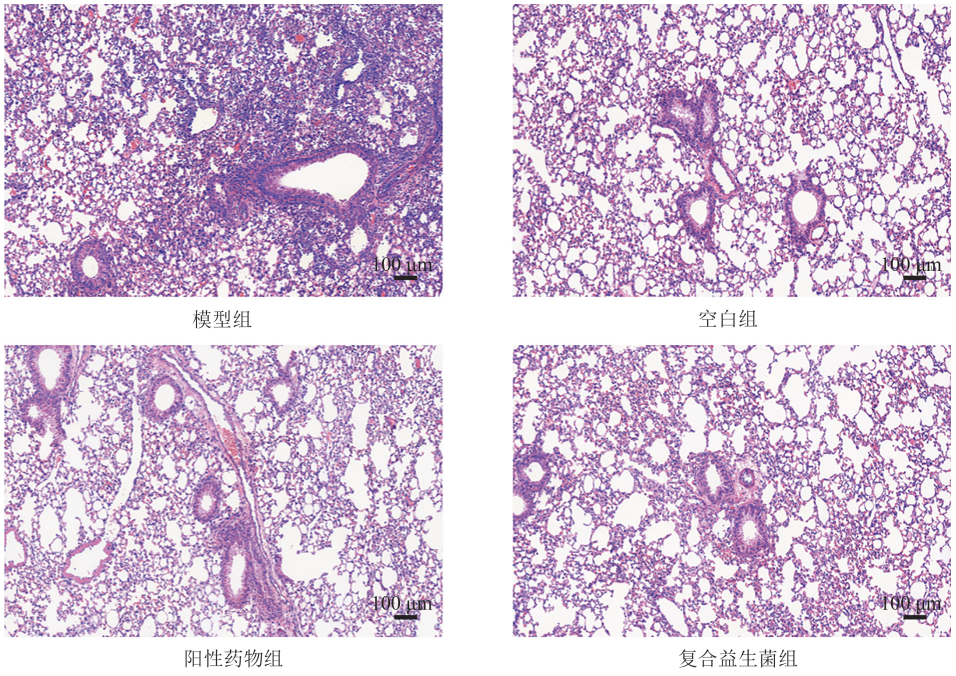


图 2　HE 染色的肺组织样本显微照片

Fig. 2　Micrographs of lung tissue samples stained with hematoxylin and eosin

2.2　复合益生菌对小鼠系统免疫应答的影响

血清细胞因子可以反映流感病毒感染过程中免疫系统的激活程度、炎症反应的强度以及细胞免疫的效应。流感病毒感染过程中，宿主的免疫系统会释放大量细胞因子（如 TNF-α、IL-6、IL-10 等）、趋化因子等炎症介质。这些介质导致血管扩张、毛细血管渗漏和炎性细胞的大量聚集和激活，从而造成组织损伤和功能障碍[19]。复合益生菌对于甲型 H1N1 流感进程中过度的炎症反应有着独特的调节作用。如图 3 所示，口服复合益生菌后血清中促炎因子 IL-6 和 TNF-α 的质量浓度显著降低，表明治疗可能抑制了促炎因子的过度释放，缓解了机体炎症反应。IL-6、TNF-α 和 IL-1β 都是早期炎症反应的关键细胞因子，IL-6 和 IL-1β 能够吸引并激活白细胞，促进抗病毒免疫反应的开始，TNF-α 能够增强血管通透性，促进炎性细胞的迁移[20-21]。但甲型 H1N1 流感病毒感染后，血清中 IL-1β 质量浓度没有发生明显变化，考虑到细胞因子在甲型 H1N1 流感病毒感染过程中存在动态变化，这可能与采样时间点有关，因此需要进一步研究。

血液中不同类型免疫细胞比例的变化可以反

映甲型H1N1流感病毒感染后小鼠免疫系统的状态。淋巴细胞、中性粒细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞都是抵御流感等疾病发展过程中重要的免疫细胞。如图3(d)~(e)所示，模型组小鼠血液中单核细胞、中性粒细胞百分比显著增加。大量相关报道显示，流感病毒感染后中性粒细胞和单核细胞都是富集程度较高的免疫细胞，在流感进程中起到识别和清除病原体的作用[22-23]。在感染期间，呼吸道上皮细胞分泌的单核细胞趋化蛋白(MCP-1)能够促进单核细胞的聚集，形成病理免疫[23]；同时，中性粒细胞释放抗菌肽和NETs，可直接或间接抑制病原体的生长[20]。口服复合益生菌显著降低了血液里中性粒细胞百分比，这表明免疫系统可能已经得到激活，这些细胞开始往肺部迁移[23]。同时，复合益生菌的干预能够显著增强小鼠肺部抗病毒蛋白OAS1的表达，见图3(f)。OAS1表达升高对治疗甲型H1N1流感有积极影响，如增强抗病毒能力和调节免疫反应，有助于机体恢复[24]。

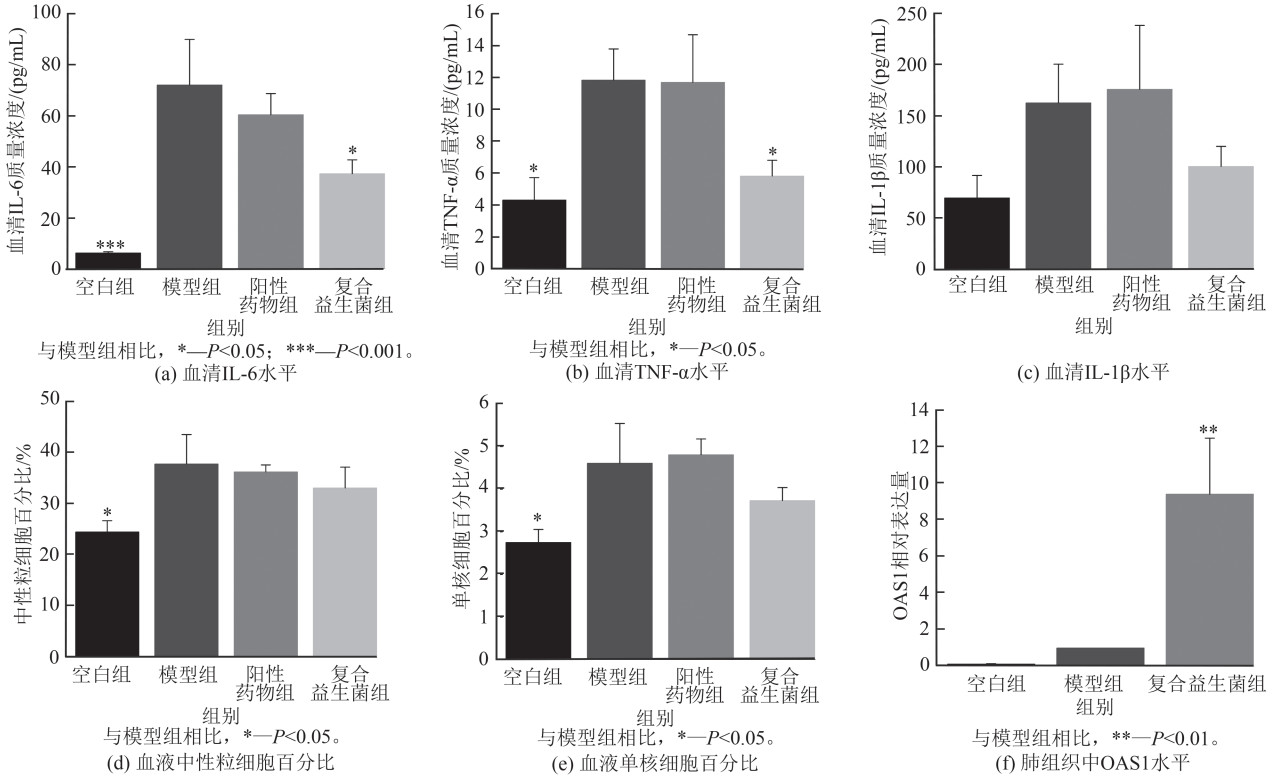


图3　复合益生菌对甲型H1N1流感小鼠免疫应答的影响

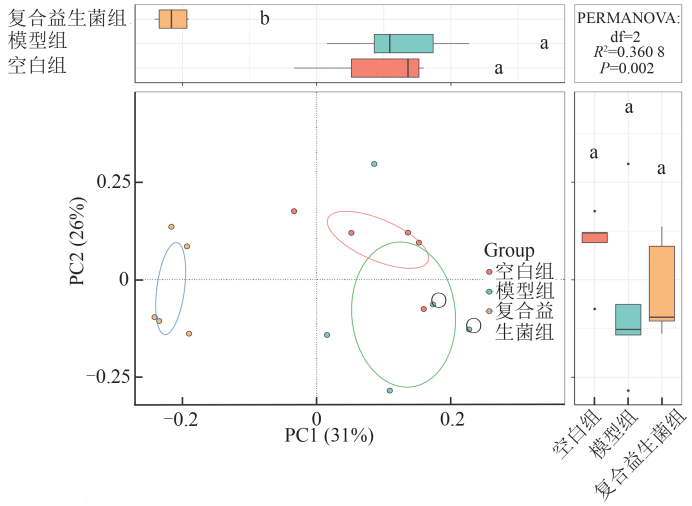
Fig. 3　Effects of the probiotic formula on the immune responses of H1N1 infection mice

2.3　复合益生菌对小鼠肠道菌群的影响

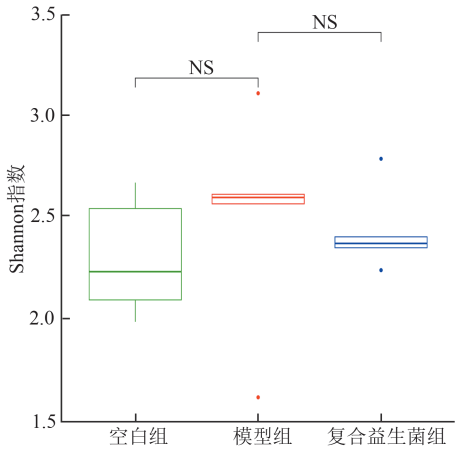
虽然流感主要通过呼吸道传播并引发感染，但肠道菌群在流感的病程中也发挥着重要作用[25]。对肠道菌群进行16S rRNA测序，研究复合益生菌干预对甲型H1N1流感小鼠肠道菌群的调节作用。如图4所示，模型组和复合益生菌组中，Shannon、Simpson和Pielou指数无显著变化，口服复合益生菌对肠道菌群的α多样性无显著影响，说明肠道菌群的丰富度和均匀度水平相当。β多样性分析结果显示，各组小鼠肠道菌群的β多样性存在显著差异，说明复合益生菌能够重塑甲型H1N1流感小鼠的肠道菌群结构。

根据肠道菌群属水平聚类分析结果可知，复合益生菌组对属水平肠道菌群相对丰度有显著影响，见图5(a)。为探究复合益生菌对肠道菌群的特异性调节作用，根据肠道菌群相对丰度结果可知，能够缓解甲型H1N1流感症状的复合益生菌增加了肠道菌群中副拟杆菌属(*Parabacteroides*)等的相对丰度，见图5(b)。

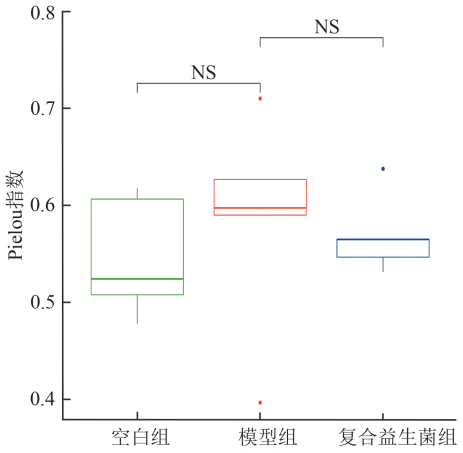
利用LEfSe分析各组与模型组之间肠道菌群组成的差异。与空白组相比，模型组小鼠肠道中EC_*Eubacterium_xylanophilum* group、*Romboutsia*、*Enterorhabdus*、*Roseburia*等菌属相对丰度增加，*Rikenella*等菌属相对丰度减少，见图6(a)。在Li



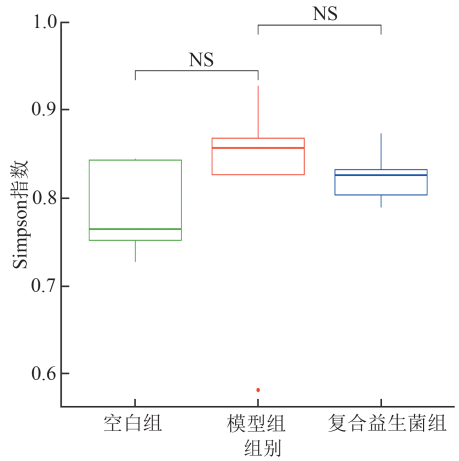
不同小写字母表示各水平间存在显著性差异(P<0.05)。
(a) β多样性



NS—不具有显著性差异(P>0.05)。
(b) Shannon指数



NS—不具有显著性差异(P>0.05)。
(c) Pielou指数



NS—不具有显著性差异(P>0.05)。
(d) Simpson指数

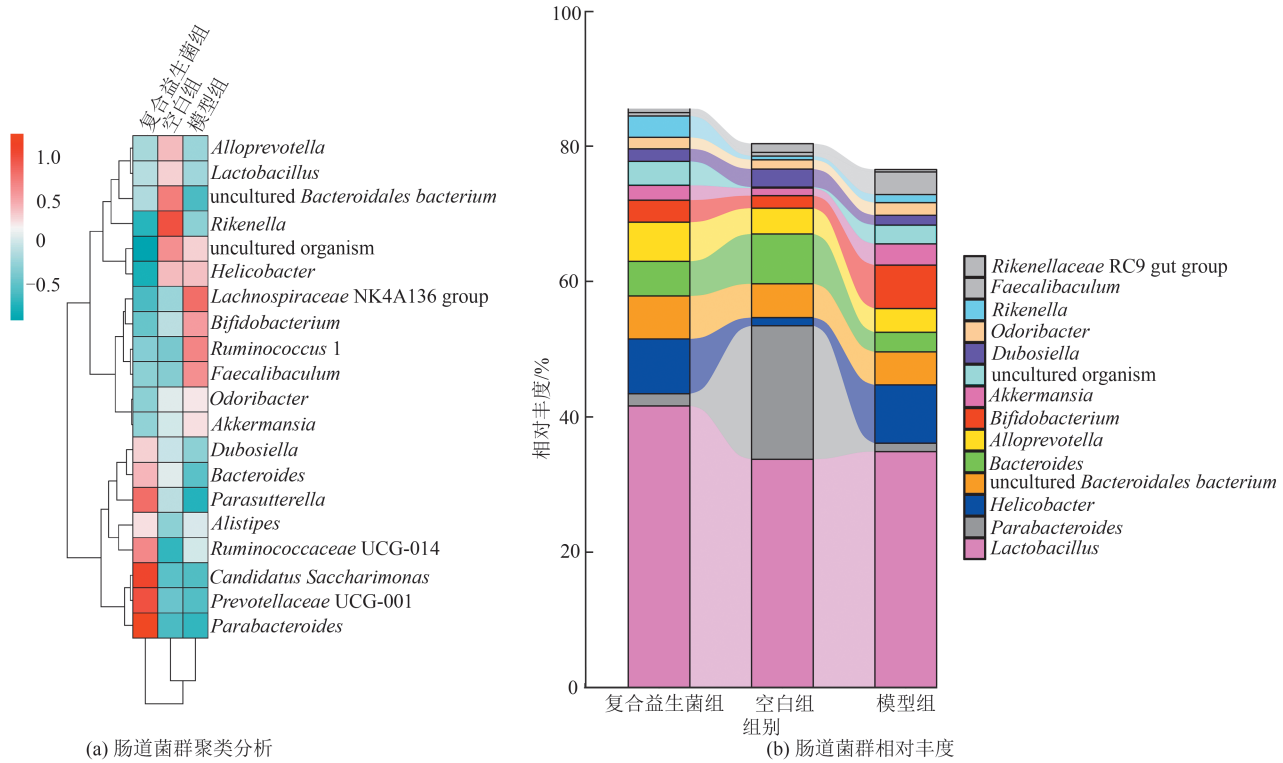
图 4　肠道菌群多样性分析

Fig. 4　Diversity of the gut microbiota

等[26]的研究中，甲型 H1N1 流感病毒会导致 *Parabacteroides* 相对丰度的降低，复合益生菌的干预则逆转了这一过程，有助于机体恢复。王倩雯等[27]研究表明，益生菌干预能降低流感小鼠肠道中 *Eubacterium* 的相对丰度，*Eubacterium* 相对丰度可能与流感感染程度呈正相关。与模型组相比，复合益生菌干预后小鼠肠道中 *Marvinbryantia* 和 *Ruminococcaceae* UGG_007 等菌属的相对丰度增加，*Lachnospiraceae* NK4A136 group、*Romboutsia*、*Candidatus Arthromitus* 等菌属的相对丰度减少，见图 6(b)。其中 *Ruminococcaceae* 相对丰度的增加与免疫系统的状态呈正相关[28-30]。因此，复合益生菌可能通过肠道菌群来调节宿主的免疫反应，以此来达到缓解甲型 H1N1 流感症状的目的。

2.4　复合益生菌对小鼠肠道代谢物的影响

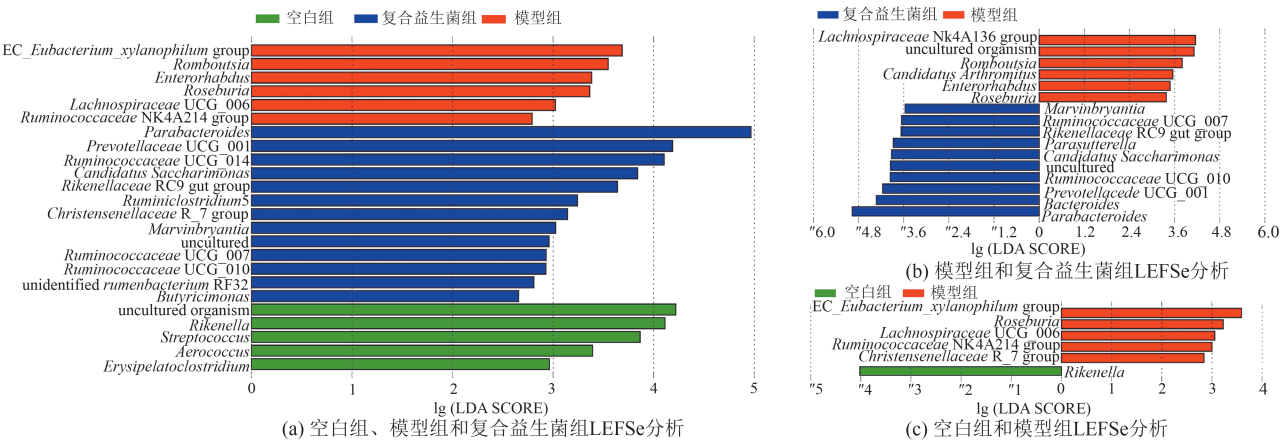
为了探究复合益生菌干预的作用，使用 LC-MS 对空白组、模型组和复合益生菌组小鼠的粪便样本进行非靶向代谢组学分析，以鉴定不同的代谢产物。如图 7 所示，PLS-DA 和 SPLS-DA 均显示空白组、模型组和复合益生菌组存在显著差异。然后作者分析了复合益生菌干预对相对丰度排名前 20 的代谢物组成的影响。甲型 H1N1 病毒感染后，未命名物质 1、来米地平(lemildipine)相对丰度上调，经过复合益生菌干预后，上述物质的相对丰度向空白组靠近。甲型 H1N1 流感病毒使诺



(a) 肠道菌群聚类分析　　(b) 肠道菌群相对丰度

图5　小鼠肠道菌群属水平组成分析

Fig. 5　Genus-level composition of the gut microbiota in mice



(a) 空白组、模型组和复合益生菌组LEFSe分析　　(b) 模型组和复合益生菌组LEFSe分析　　(c) 空白组和模型组LEFSe分析

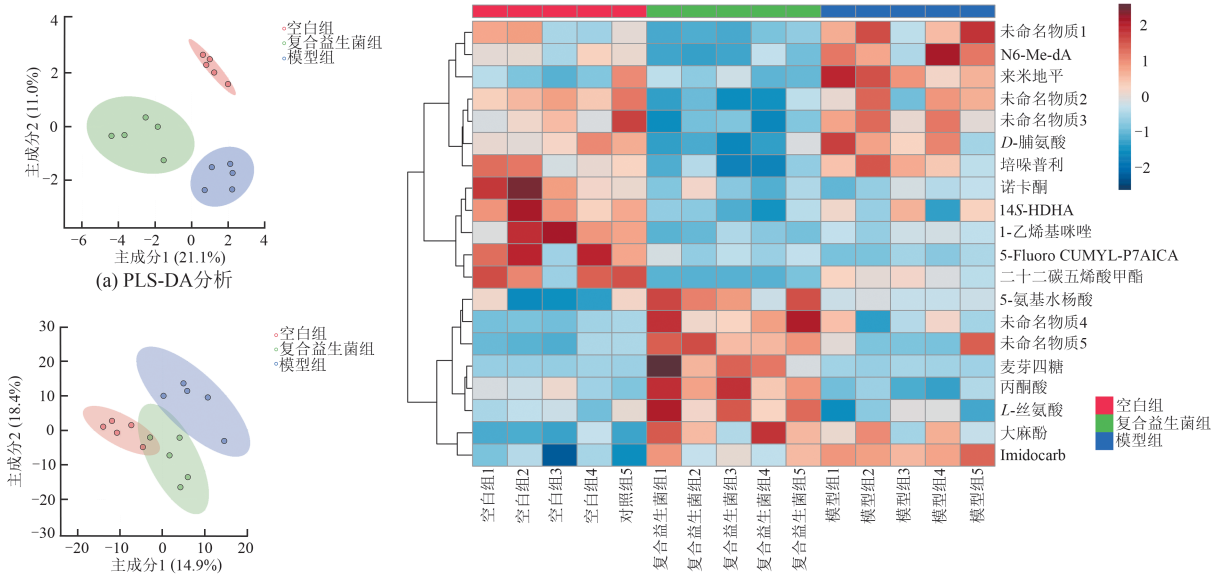
图6　小鼠肠道菌群属水平LEFSe分析

Fig. 6　LEFSe of the gut microbiota at the genus level in mice

卡酮(nootkatone)、14*S*-羟基二十二碳六烯酸(14*S*-HDHA)、1-乙烯基咪唑(1-vinylimidazole)、二十二碳五烯酸甲酯等相对丰度进一步下调，见图7(c)，其中14*S*-HDHA是二十二碳六烯酸(DHA)的代谢产物，大量研究表明，DHA相对丰度的增加可以缓解宿主流感症状[31-32]，二十二碳五烯酸甲酯是二十二碳五烯酸(DPA)的甲基酯形式，它在抗炎反应中可能具有积极作用[33-34]，复合益生菌的干预并没有逆转14*S*-HDHA相对丰度下调的趋势，能否通过口服DHA来缓解流感症状值得进一步研究。

之后，通过随机森林分析筛选最具显著性的代谢物。丙酮酸在各组中都显示出较高的辨别度，见图8。分析肠道代谢物发现，在小鼠流感模型中有5种物质相对丰度下调，其中丙酮酸在随机森林分析中显示出较强的分辨度。丙酮酸在免疫功能中发挥关键作用，能够促进T细胞和B细胞

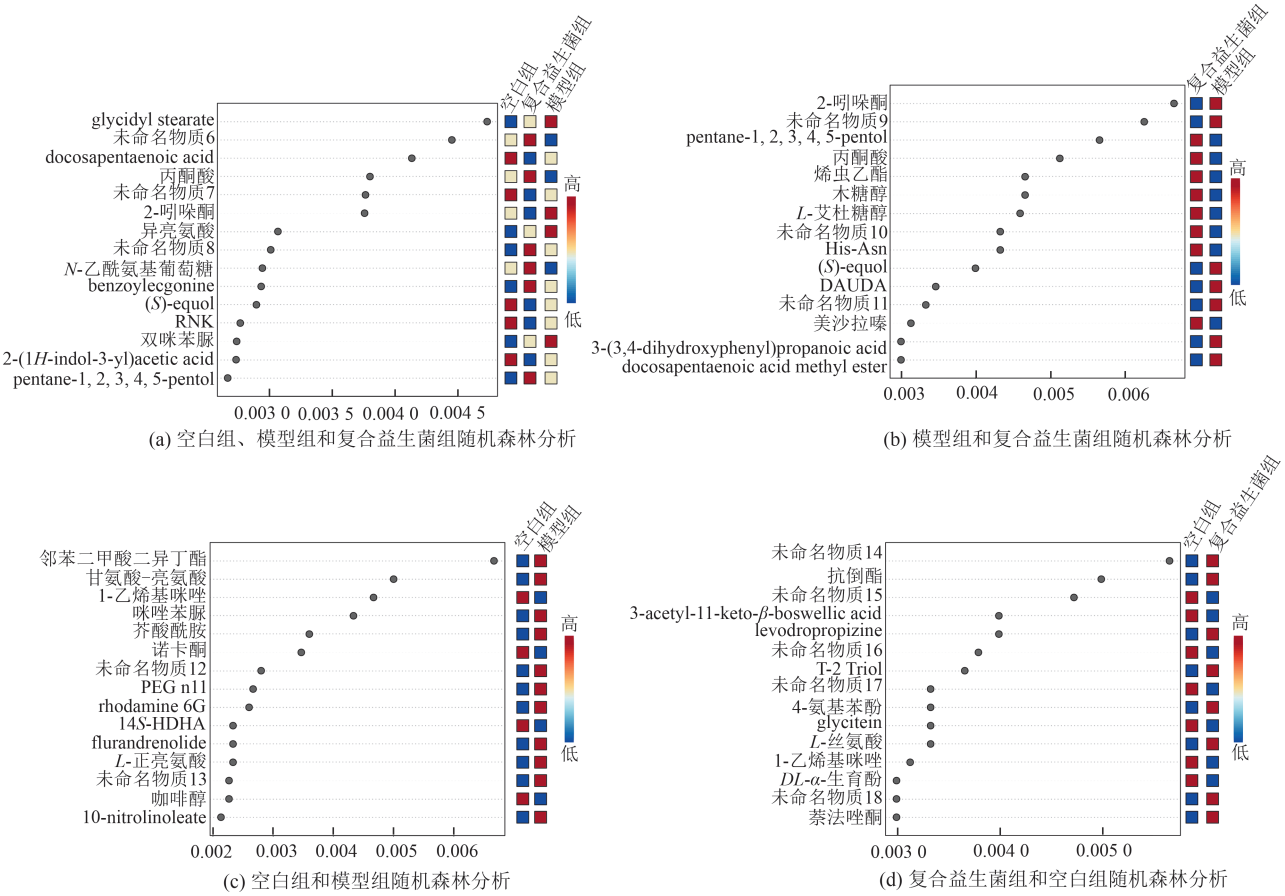
的增殖与分化，提升炎症介质的释放，增强免疫反应[35-36]。总之，在甲型H1N1流感病毒和复合益生菌对肠道菌群的影响中，丙酮酸可能是关键代谢物之一。



(a) PLS-DA分析　(b) SPLS-DA分析　(c) 肠道代谢物可视化热图

图 7　复合益生菌对小鼠肠道代谢物的影响

Fig. 7　Effects of the probiotic formula on gut metabolites in mice



(a) 空白组、模型组和复合益生菌组随机森林分析　(b) 模型组和复合益生菌组随机森林分析

(c) 空白组和模型组随机森林分析　(d) 复合益生菌组和空白组随机森林分析

图 8　小鼠肠道代谢物随机森林分析

Fig. 8　Random forest analysis of gut metabolites in mice

3 结论

由多种益生菌及膳食因子组成的复合益生菌能够从维持体质量、减少肺部损伤、减轻炎症反应等多个方面缓解甲型H1N1流感症状，这可能与复合益生菌增强免疫细胞功能和全身免疫反应的功能有关。同时，肠道基因组和代谢组分析结果表明，多种菌群及代谢物在流感进程中的变化与先前的研究保持一致。此外，先前研究多聚焦单一菌株或膳食因子的效果，将多种益生菌与膳食因子进行组合可以从多个方面缓解流感症状，同时还可弥补疫苗和抗流感药物的缺陷，为通过肠-肺轴来防治流感提供了潜在靶点和新思路。由于作者在小鼠感染前就开始给予复合益生菌，因此肠道菌群在小鼠感染流感病毒前已发生变化。未来的研究需要评估感染后服用复合益生菌是否仍能改善甲型H1N1流感的症状。

参考文献

[1] TSAI S Y, SEGOVIA J A, CHANG T H, et al. DAMP molecule S100A9 acts as a molecular pattern to enhance inflammation during influenza A virus infection: role of DDX21-TRIF-TLR4-MyD88 pathway[J]. PLoS Pathogens, 2014, 10(1): e1003848.

[2] HEROLD S, BECKER C, RIDGE K M, et al. Influenza virus-induced lung injury: pathogenesis and implications for treatment[J]. European Respiratory Journal, 2015, 45(5): 1463-1478.

[3] ZHANG S P, WEI T T, TIANV H, et al. Small intestinal injury in mice infected with respiratory influenza A virus: evidence for virus induced gastroenteritis [J]. Biotechnology Letters, 2015, 37(8): 1585-1592.

[4] TROEGER C, FOROUZANFAR M, RAO P C, et al. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory tract infections in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2017, 17(11): 1133-1161.

[5] VOGEL A B, LAMBERT L, KINNEAR E, et al. Self-amplifying RNA vaccines give equivalent protection against influenza to mRNA vaccines but at much lower doses[J]. Molecular Therapy, 2018, 26(2): 446-455.

[6] RADNER H, SIEGHART D, JORDA A, et al. Reduced immunogenicity of BNT162b2 booster vaccination in combination with a tetravalent influenza vaccination: results of a prospective cohort study in 838 health workers[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2023, 29(5): 635-641.

[7] JACKSON M L, CHUNG J R, JACKSON L A, et al. Influenza vaccine effectiveness in the United States during the 2015—2016 season[J]. New England Journal of Medicine, 2017, 377(6): 534-543.

[8] WYPYCH T P, WICKRAMASINGHE L C, MARSLAND B J. The influence of the microbiome on respiratory health [J]. Nature Immunology, 2019, 20(10): 1279-1290.

[9] TROMPETTE A, GOLLWITZER E S, YADAVA K, et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis[J]. Nature Medicine, 2014, 20(2): 159-166.

[10] 马微微，武亚男，张昕仪，等. 鼠李糖乳酪杆菌Glory LG12对克林霉素诱导小鼠肠道菌群紊乱的影响[J]. 食品与生物技术学报，2024，43(4)：114-120.
MA W W, WU Y N, ZHANG X Y, et al. Effect of *Lacticaseibacillus rhamnosus* Glory LG12 on clindamycin-induced intestinal flora disorders in mice[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2024, 43(4): 114-120. (in Chinese)

[11] 孟潇，刘成龙，陈晨，等. 无佐剂卵清蛋白致敏BALB/c小鼠的肠道菌群变化[J]. 食品与生物技术学报，2024，43(3)：14-25.
MENG X, LIU C L, CHEN C, et al. Exploration of gut microbiota changes in BALB/c mice sensitized with ovalbumin without immunologic adjuvant[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2024, 43(3): 14-25. (in Chinese)

[12] 陈峰，马微微，于雷雷，等. 植物乳杆菌CCFM8661增强小鼠免疫力的功能评价[J]. 食品与生物技术学报，2024，43(5)：37-43.
CHEN F, MA W W, YU L L, et al. Functional evaluation of *Lactiplantibacillus plantarum* CCFM8661 for enhancing immunity in mice[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2024, 43(5): 37-43. (in Chinese)

[13] DANG A T, MARSLAND B J. Microbes, metabolites, and the gut-lung axis[J]. Mucosal Immunology, 2019, 12(4): 843-850.

[14] 屈青云，许伟，胡源，等. 抗性淀粉饮食模式下*L*-茶氨酸对大鼠肠道免疫功能的调节作用[J]. 食品与机械，2021，37(12)：32-39，51.
QU Q Y, XU W, HU Y, et al. Effect of *L*-theanine on intestinal immunity of rats under resistant starch feeding[J]. Food & Machinery, 2021, 37(12): 32-39, 51. (in Chinese)

[15] LIU X Y, FANG Z F, DENG Y D, et al. Oral administration of probiotics protected mice from influenza virus infection[J]. Food Bioscience, 2021, 41: 100804.

[16] AKATSU H, NAGAFUCHI S, KURIHARA R, et al. Enhanced vaccination effect against influenza by

prebiotics in elderly patients receiving enteral nutrition [J]. Geriatrics & Gerontology International, 2016, 16 (2): 205-213.

[17] ZHENG F L, WANG Z, STANTON C, et al. *Lactobacillus rhamnosus* FJSYC4-1 and *Lactobacillus reuteri* FGSZY33L6 alleviate metabolic syndrome *via* gut microbiota regulation [J]. Food & Function, 2021, 12 (9): 3919-3930.

[18] BELKACEM N, BOURDET-SICARD R, TAHA M K. *Lactobacillus paracasei* feeding improves the control of secondary experimental meningococcal infection in flu-infected mice [J]. BMC Infectious Diseases, 2018, 18 (1): 167.

[19] KUPPALLI K, RASMUSSEN A L. A glimpse into the eye of the COVID-19 cytokine storm [J]. eBioMedicine, 2020, 55: 102789.

[20] MONSALVO A C, BATALLE J P, LOPEZ M F, et al. Severe pandemic 2009 H1N1 influenza disease due to pathogenic immune complexes [J]. Nature Medicine, 2010, 17(2): 195-199.

[21] BERMEJO-MARTIN J F, ORTIZ DE LEJARAZU R, PUMAROLA T, et al. Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza [J]. Critical Care, 2009, 13(6): R201.

[22] CODO A C, DAVANZO G G, DE BRITO MONTEIRO L, et al. Elevated glucose levels favor SARS-CoV-2 infection and monocyte response through a HIF-1α/glycolysis-dependent axis [J]. Cell Metabolism, 2020, 32 (3): 498-499.

[23] TREON S P, CASTILLO J J, SKARBNIK A P, et al. The BTK inhibitor ibrutinib may protect against pulmonary injury in COVID-19-infected patients [J]. Blood, 2020, 135(21): 1912-1915.

[24] FUJII T, JOUNAI K, HORIE A, et al. Effects of heat-killed *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM 5805 on mucosal and systemic immune parameters, and antiviral reactions to influenza virus in healthy adults: a randomized controlled double-blind study [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 35: 513-521.

[25] STEED A L, CHRISTOPHI G P, KAIKO G E, et al. The microbial metabolite desaminotyrosine protects from influenza through type I interferon [J]. Science, 2017, 357(6350): 498-502.

[26] LI X P, WANG M Z, LIU C, et al. Qingfeiyin decoction inhibits H1N1 virus infection *via* modulation of gut microbiota and inflammatory pathways in a murine model [J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 874068.

[27] 王倩雯, 方志锋, 张评浒, 等. 益生菌对 H3N2 流感病毒感染的特异性缓解作用 [J]. 食品与发酵工业, 2022, 48 (19): 79-85.
WANG Q W, FANG Z F, ZHANG P H, et al. Specific mitigative effect of probiotics on influenza A virus H3N2 infection [J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48 (19): 79-85. (in Chinese)

[28] HAKOZAKI T, RICHARD C, ELKRIEF A, et al. The gut microbiome associates with immune checkpoint inhibition outcomes in patients with advanced non-small cell lung cancer [J]. Cancer Immunology Research, 2020, 8(10): 1243-1250.

[29] YANG R C, GUO Y X, ZHANG S, et al. Effect of *Dioscorea* opposite waste supplementation on antioxidant capacity, immune response and rumen microbiome in weaned lambs [J]. Fermentation, 2023, 9(3): 256.

[30] HUO W Y, FENG Z P, HU S Y, et al. Effects of polysaccharides from wild morels on immune response and gut microbiota composition in non-treated and cyclophosphamide-treated mice [J]. Food & Function, 2020, 11(5): 4291-4303.

[31] RAMON S, BAKER S F, SAHLER J M, et al. The specialized proresolving mediator 17-HDHA enhances the antibody-mediated immune response against influenza virus: a new class of adjuvant? [J]. Journal of Immunology, 2014, 193(12): 6031-6040.

[32] SCHULTZ D, METHLING K, GROUP K S, et al. Eicosanoid profile of influenza a virus infected pigs [J]. Metabolites, 2019, 9(7): 130.

[33] MA Q M, ZHU C S, CAOILI K, et al. The novel omega-6 fatty acid docosapentaenoic acid positively modulates brain innate immune response for resolving neuroinflammation at early and late stages of humanized APOE-based Alzheimer's disease models [J]. Alzheimer's & Dementia, 2020, 16(9): e044178.

[34] CIALDELLA-KAM L, NIEMAN D C, KNAB A M, et al. A mixed flavonoid-fish oil supplement induces immune-enhancing and anti-inflammatory transcriptomic changes in adult obese and overweight women: a randomized controlled trial [J]. Nutrients, 2016, 8(5): 277.

[35] AOKI R, AOKI-YOSHIDA A, SUZUKI C, et al. Indole-3-pyruvic acid, an aryl hydrocarbon receptor activator, suppresses experimental colitis in mice [J]. Journal of immunology, 2018, 201(12): 3683-3693.

[36] TAI H, LIN C, YAN J, et al. Indole-3-pyruvic acid alleviates rheumatoid arthritis *via* the aryl hydrocarbon receptor pathway [J]. Annals of translational medicine, 2023, 11(5): 213.

(责任编辑: 史润东东)