

李震,刘志勇,张永,等.天然蜂粮对高脂血症大鼠肠道微生物多样性的影响[J].江西农业大学学报,2019,41(6):1159-1166.



# 天然蜂粮对高脂血症大鼠肠道微生物多样性的影响

李震<sup>1</sup>,刘志勇<sup>2</sup>,张永<sup>1</sup>,张祖芸<sup>1,3</sup>,曾志将<sup>1\*</sup>

(1.江西农业大学 蜜蜂研究所,江西 南昌 330045;2.江西中医药大学 实验动物科技中心,江西 南昌 330006;3.云南省农业科学院 蚕桑蜜蜂研究所,云南 蒙自 661100)

**摘要:**为研究天然蜂粮对大鼠肠道微生物结构和多样性的影响。使用3个剂量(80,400,800 mg/kg)蜂粮持续灌胃高脂血症大鼠60 d后,取其直肠内容物利用16S rDNA高通量测序技术测定大鼠肠道中菌群结构及其多样性。结果表明:从Alpha多样性指数(Shannon、Simpson)、丰富度指数(Chao、Ace)可知,患有高脂血症的大鼠肠道中细菌多样性有下降趋势。从门水平上分析,5个组的大鼠肠道中厚壁菌门Firmicutes、拟杆菌门Bacteroidetes和疣微菌门Verrucomicrobia,占到了总细菌的94%以上。与高脂模型组相比,天然蜂粮高剂量组大鼠肠道中变形菌门Proteobacteria丰度显著上升( $P<0.05$ )。从属水平上分析,与空白对照组相比,3个天然蜂粮剂量组的大鼠肠道中拟杆菌属Bacteroides、粪球菌属Coprococcus和Paraprevotella丰度显著下降( $P<0.05$ );与高脂模型组相比,3个天然蜂粮组大鼠肠道中Akkermansia丰度有上升趋势( $P>0.05$ )。

**关键词:**天然蜂粮;大鼠;肠道微生物;多样性

**中图分类号:**S896 **文献标志码:**A **文章编号:**1000-2286(2019)06-1159-08

## Effect of Natural Bee Bread on Intestinal Microbial Diversity in Rats with Hyperlipidemia

LI Zhen<sup>1</sup>, LIU Zhi-yong<sup>2</sup>, ZHANG Yong<sup>1</sup>, ZHANG Zu-yun<sup>1,3</sup>, ZENG Zhi-jiang<sup>1\*</sup>

(1.Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2.Laboratory Animal Science and Technology Center, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China; 3.Sericultural and Apicultural Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Mengzi, Yunnan 661100, China)

**Abstract:** This experiment aimed to investigate the effects of natural bee bread on the structure and diversity of intestinal microorganisms in rats. After 60 days of continuous administration of three doses of bee bread (80, 400, 800 mg/kg) to hyperlipidemic rats, the rectal contents were collected and the structure and diversity of the rumen bacterial community were measured with 16S rDNA sequencing technology. The result of Alpha diversity index (Shannon, Simpson) and the richness index (Chao, Ace) showed that the intestinal bacterial di-

收稿日期:2019-08-12 修回日期:2019-09-25

基金项目:国家蜂产业技术体系项目(CARS-44-KXJ15)和国家自然科学基金项目(31872432)

Project supported by the Earmarked Fund for the China Agricultural Research System (CARS-44-KXJ15) and the National Natural Science Foundation of China (31872432)

作者简介:李震(1995—),男,硕士生,主要从事蜜蜂生物学研究,orcid.org/0000-0002-1418-9428, zhenli1995@sina.com; \*通信作者:曾志将,教授,博士,orcid.org/0000-0001-5778-4115, bees1965@sina.com。

versity in the rats with hyperlipidemia had a downward trend. And the results of 16S rDNA sequencing showed that according to the analysis at phylum level, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* and *Verrucomicrobia* in the intestinal tract of rats in five groups accounted for more than 94% of the total bacteria. Compared with the high-fat model group, the *Proteobacteria* abundance in the intestinal tract of rats in the high dose bee bread group increased significantly ( $P < 0.05$ ). The analysis at the genus level showed that compared with the blank control group, the abundance of *Bacteroides*, *Coprococcus* and *Paraprevotella* in the intestinal tract of the rats in the three natural bee bread dose groups decreased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with the high-fat model group, the *Akkermansia* abundance in the intestinal tract of the rats in the three bee bread groups increased ( $P > 0.05$ ).

**Keywords:** natural bee bread; rats; gut microorganisms; diversity

高脂血症是粥样动脉硬化的始动因素,粥样动脉硬化会进一步引起冠心病、2型糖尿病、高血压、非酒精性脂肪肝、癌症和肾衰竭等一系列疾病<sup>[1-2]</sup>。随着人们生活水平的提高和生活方式的改变,高脂血症的发病率逐年上升。2012年全国营养调查结果显示,成人高TG血症、高TC血症和低HDL血症患病率分别为13.1%、4.9%和33.9%<sup>[3]</sup>。截至2015年,全国成人患脂质代谢异常疾病已经高达40.4%<sup>[4]</sup>。不仅成人患病率持续增加,青少年和老年人患病率也呈上升趋势<sup>[5]</sup>。导致高脂血症的因素很多,包括饮食习惯、日常生活、心理压力和社会环境因素,过量的能量摄入和缺乏锻炼是引起高脂血症的主要因素。

人肠道内含有大量的共生微生物,统称为“肠道微生物群”,它们对维持粘膜屏障功能的完整性、吸收营养物质和能量平衡至关重要<sup>[6]</sup>。最近的证据表明,肠道微生物群可能在高脂血症及其并发症的发展中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。高脂饮食可能会诱导肠道菌群结构发生改变甚至紊乱,例如高脂饮食模式下人和小鼠肠道中厚壁菌门肠道菌的丰度增加,能够通过提高食物中能量的摄取、加速脂肪酸合成以及促进甘油三酯和胆固醇沉积等方式造成高脂血症<sup>[8-9]</sup>。因此,通过科学调节肠道优势“瘦菌群”的丰度,可能是继节食、锻炼等手段之后来治疗高脂血症的新途径<sup>[9]</sup>。当前,利用天然产物及其提取产物来治疗高脂血症仍为研究热点<sup>[10-12]</sup>。而天然蜂粮作为一种新型蜂产品,含有大量有利于降血脂的活性成分,如多糖、类黄酮化合物以及多酚类物质等<sup>[13-14]</sup>。天然蜂粮对高脂血症大鼠有显著降血脂效果<sup>[14]</sup>。但天然蜂粮对高脂血症大鼠个体肠道菌群结构的影响却尚未见报道。因此,在本研究中以SPF级大鼠构建高脂血症模型,灌胃天然蜂粮60 d以后,通过16S rDNA高通量测序法研究天然蜂粮对大鼠肠道微生物结构及多样性的影响。探究天然蜂粮对高脂血症大鼠肠道菌群结构和多样性的影响,为天然蜂粮的深度开发提供科学理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 天然蜂粮的生产 采用江西农业大学蜜蜂研究所研制天然蜂粮生产器,2018年7—8月利用西方蜜蜂(*Apis mellifera*)在江西省石城县白莲花期时生产天然蜂粮<sup>[15-16]</sup>,生产的天然蜂粮密封瓶装放入-18℃冰柜中保存备用。

1.1.2 实验动物 SPF级SD大鼠70只,体质量(93.44±1.19)g,单一雄性,由江西中医药大学实验动物科技中心提供,合格证号:SCXK(赣)2018-0003。实验小鼠用饲料和垫料统一由湖北万千佳兴有限公司提供。实验大鼠饲养在江西中医药大学实验动物科技中心SPF级屏障系统内,环境温度为20~23℃、湿度45%~55%,使用许可号为SYXK(赣)2018-0004。

1.1.3 主要实验器材与设备 电子台秤(上海亚津电子科技有限公司)和全自动生化仪(贝克曼AU480)。

1.1.4 高脂饲料配方 88.9%基础饲料、10%黄油、1%胆固醇和0.1%猪胆盐。

### 1.2 试验方法

1.2.1 大鼠造模及降血脂试验 大鼠适应性饲养4 d后开始试验,其中空白对照组饲喂普通基础饲料,其余各组饲喂高脂饲料。大鼠高脂血症模型成功后,选32只进行试验,分为4个实验组,每组大鼠8只。参照人推荐用量0.4 g/(d·kg)(即人用量400 mg/(d·kg))<sup>[14]</sup>,设立3个天然蜂粮试验组:天然蜂粮低剂量组(BL),80 mg/(d·kg);天然蜂粮中剂量组(BM),400 mg/(d·kg);天然蜂粮高剂量(BH),800 mg/(d·kg)。

高脂模型对照组(M)。同时设1个空白对照组(C)。3个蜂粮组以及高脂模型持续饲喂高脂饲料,但3个蜂粮组同时分别按剂量设计灌胃天然蜂粮;空白对照组一直饲喂正常基础饲料。灌胃持续60 d。

1.2.2 大鼠肠道菌群细菌16S rDNA测序分析 第60天麻醉处死所有大鼠,每组随机选取3只大鼠取其直肠粪便后立即放入液氮保存。粪便样本提取细菌DNA后,再以获得的细菌DNA为模板进行细菌16S rDNA V4可变区PCR扩增。采用Illumina HiSeq2000测序技术对16S rDNA V4区PCR产物进行测序。得到的原始数据和reads进行去除接头序列、低复杂度序列和低质量序列的处理,得到高通量下机原始碱基序列,用下机得到的数据进行相应的生物信息分析(华大基因)。

### 1.3 数据统计分析

实验所获得的数据全部利用Statview 5.01软件中的“ANOVA or ANCOVA”进行比较分析不同组大鼠肠道中各类微生物含量的差异显著性( $P < 0.05$ , LSD多重比较)。

## 2 结果与分析

### 2.1 测序数据的真实度

2.1.1 OTU累积曲线和相对PCA分析 通过构建累积曲线,用于描述随着抽样量的加大,物种增加的状况。横坐标代表样品数目,纵坐标代表OTU数目(检测到的物种数)。由图1可知,随着抽样个数的上升,发现的物种数越来越多;而随着抽样量的继续上升,曲线末端上升趋势趋于平缓,表明本次采样量已基本覆盖所有的肠道细菌菌群。

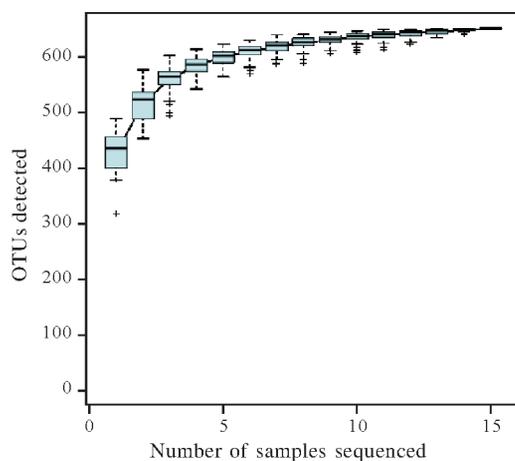


图1 OTU累积曲线

Fig.1 OTU cumulative curve

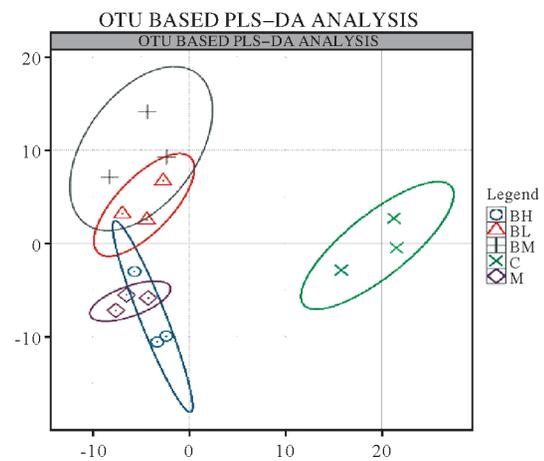


图2 OTU PLS-DA分析

Fig.2 OTU PLS-DA analysis chart

PLS-DA方法可将主成分分析和多元回归的功能相结合,达到循环PCA的各个成分以使其之间的间隔达到最大化,即相对PCA分析,结果见图2。C组与M、BL、BM、BH组相距最远,说明C组与其它4组间肠道菌群丰度差异较大。同时可以看出每组采集的3个样品间距离较近,说明同组3份样品肠道菌群丰度差异较小,采样比较合理。

2.1.2 Shannon 稀释曲线 稀释曲线可评价测序量是否足够,并间接反映样品中物种的丰富程度,当曲线趋于平缓或达到平台期时可认为测序深度增加已经不影响物种多样性,测序量趋于饱和。由图3可知,当测序深度为55 000 reads时,曲线趋于平缓,各样品中物种多样性达到饱和状态。

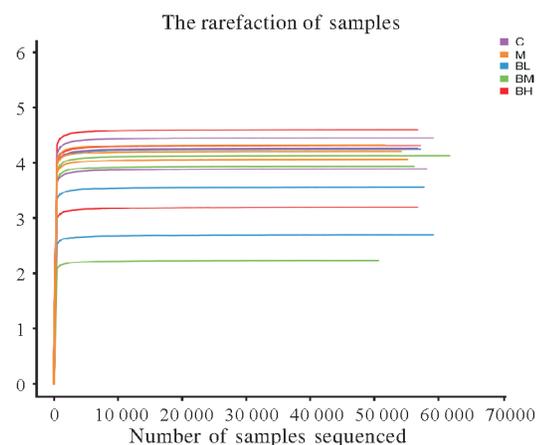


图3 5个实验组粪便样品的Shannon指数稀释曲线  
Fig.3 Shannon index dilution curve of fecal samples in 5 experimental groups

### 2.2 天然蜂粮对大鼠肠道细菌菌群多样性的影响

#### 2.2.1 OTU 比较 5 个处理组 (C、M、BL、BM、BH)

大鼠直肠粪便样本中分别检测到 569、510、520、552 和 554 个 OTU, 其中 5 个组共有的 OTU 数为 408 个(图 4)。5 个处理组各自特有的 OUT 为 31 个(占 C 总 OTU 的 5.45%), 5 个(占 M 总 OTU 的 0.98%), 1 个(占 BL 总 OTU 的 0.19%), 8 个(占 BM 总 OTU 的 1.45%), 14 个(占 BH 总 OTU 的 2.53%)。

2.2.2 Alpha 多样性分析 通过分析直肠粪便样品的多样性(Alpha diversity)来检测大鼠肠道中细菌物种的丰富度以及多样性。Chao 指数和 Ace 指数是生态统计学中用来估计群落中含 OTU 数目的两种指数。Chao 指数和 Ace 指数越高, 表明样本中的菌类总数越多。由表 1 可知: 5 组粪便样本 DNA 文库的覆盖率都在 99.8% 以上, 能够较好地反应样本的情况。与高脂模型组相比, 低剂量组和中剂量蜂粮组的 Chao 指数和 Ace 指数减少 ( $P>0.05$ ); 而高剂量蜂粮组的 Chao 指数和 Ace 指数均增加 ( $P>0.05$ )。

Shannon 指数和 Simpson 指数的大小用来表示群落丰度的高低。Shannon 指数越大, 代表群落多样性越高; 而 Simpson 指数越大, 代表群落多样性越低。结合 2 种指数可以看出, 与高脂模型组相比, 3 个天然蜂粮剂量组肠道菌落丰度均有下降的趋势 ( $P>0.05$ )。但是随着剂量的升高, 这种下降趋势会减缓。

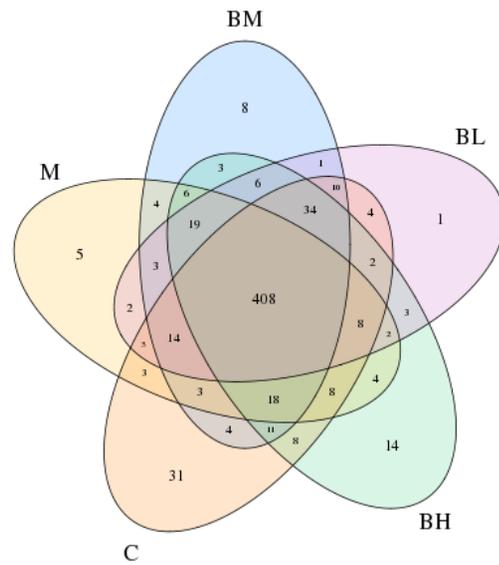


图 4 5 个处理组大鼠直肠粪便样本中的 OTU 韦恩图  
Fig.4 OTU Wayne diagram in rectal stool samples of rats in 5 treatment groups

表 1 5 组粪便样品 Alpha 多样性指数统计 ( $\bar{X}\pm SE$ )

Tab.1 Alpha diversity index statistics of five groups of fecal samples ( $\bar{X}\pm SE$ )

项目 Items	C	M	BL	BM	BH
Chao index	486.582±19.587 <sup>a</sup>	447.976±7.922 <sup>a</sup>	445.347±17.339 <sup>a</sup>	433.724±31.491 <sup>a</sup>	486.613±11.621 <sup>a</sup>
Ace index	483.591±18.170 <sup>a</sup>	443.570±7.245 <sup>a</sup>	434.240±15.059 <sup>a</sup>	423.648±32.190 <sup>a</sup>	477.214±15.376 <sup>a</sup>
Shannon index	4.193±0.162 <sup>a</sup>	4.183±0.084 <sup>a</sup>	3.482±0.443 <sup>a</sup>	3.413±0.598 <sup>a</sup>	4.013±0.419 <sup>a</sup>
Simpson index	0.053±0.015 <sup>a</sup>	0.039±0.008 <sup>a</sup>	0.144±0.067 <sup>a</sup>	0.126±0.072 <sup>a</sup>	0.077±0.050 <sup>a</sup>
Coverage	99.88%	99.87%	99.86%	99.86%	99.88%

同列字母相同表示差异不显著 ( $P>0.05$ ), 不同表示差异显著 ( $P<0.05$ )

The same lowercase letter in the same column indicated no significant difference ( $P>0.05$ ), different lowercase indicated no significant difference ( $P>0.05$ )

### 2.3 天然蜂粮对大鼠肠道细菌菌群结构的影响

2.3.1 大鼠肠道细菌门水平结构分析 5 组大鼠肠道粪便中共检测到 8 种菌门, 包括厚壁菌门 *Firmicutes*、拟杆菌门 *Bacteroidetes*、疣微菌门 *Verrucomicrobia*、变形菌门 *Proteobacteria*、软壁菌门 *Tenericutes*、放线菌门 *Actinobacteria*、蓝细菌门 *Cyanobacteria* 和 TM7。5 组粪便样品中所含的细菌门主要为 *Firmicutes*、*Bacteroidetes* 和 *Verrucomicrobia*, 占到了总细菌的 94% 以上(表 2)。从表 2 和图 5 同样可以看出, 与空白对照组相比, 高脂模型组和蜂粮高剂量组大鼠肠道中 *Tenericutes* 丰度显著下降 ( $P<0.05$ ), 蜂粮低、中剂量组大鼠肠道中 *Tenericutes* 含量差异不显著 ( $P>0.05$ )。与高脂模型组相比, 蜂粮高剂量组大鼠肠道中 *Proteobacteria* 丰度显著上升 ( $P<0.05$ ); 蜂粮低、高剂量组大鼠肠道中 *Firmicutes* 丰度有下降的趋势 ( $P>0.05$ ), 蜂粮中剂量组有上升趋势 ( $P>0.05$ ); 3 个蜂粮剂量组大鼠肠道中 *Bacteroidetes* 丰度有下降趋势, 但差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 同时 *Verrucomicrobia* 丰度有上升趋势 ( $P>0.05$ )。

表 2 天然蜂粮对大鼠肠道细菌菌群在门水平的丰度影响 ( $\bar{X} \pm SE$ )Tab.2 Effect of natural bee beard on abundance of intestinal bacterial flora at phylum level of rats ( $\bar{X} \pm SE$ )

门 Phylum	C	M	BL	BM	BH
Firmicutes	0.432±0.029 <sup>a</sup>	0.554±0.118 <sup>a</sup>	0.467±0.135 <sup>a</sup>	0.652±0.057 <sup>a</sup>	0.480±0.045 <sup>a</sup>
Bacteroidetes	0.502±0.046 <sup>a</sup>	0.360±0.130 <sup>ab</sup>	0.233±0.079 <sup>b</sup>	0.148±0.065 <sup>b</sup>	0.278±0.070 <sup>ab</sup>
Verrucomicrobia	0.048±0.028 <sup>a</sup>	0.072±0.065 <sup>a</sup>	0.283±0.151 <sup>a</sup>	0.181±0.005 <sup>a</sup>	0.190±0.113 <sup>a</sup>
Proteobacteria	0.012±0.003 <sup>a</sup>	0.013±0.003 <sup>a</sup>	0.014±0.003 <sup>a</sup>	0.012±0.006 <sup>a</sup>	0.049±0.020 <sup>b</sup>
Tenericutes	0.003±0.001 <sup>a</sup>	2.170×10 <sup>-4</sup> ±7.307×10 <sup>-5b</sup>	0.002±2.001×10 <sup>-4 ab</sup>	0.002±2.948×10 <sup>-4 a</sup>	0.001±2.079×10 <sup>-4 b</sup>
Actinobacteria	0.001±4.665×10 <sup>-4 a</sup>	9.490×10 <sup>-4</sup> ±4.539×10 <sup>-4 a</sup>	8.034×10 <sup>-4</sup> ±4.579×10 <sup>-4 a</sup>	0.003±0.003 <sup>a</sup>	7.436×10 <sup>-4</sup> ±3.539×10 <sup>-4 a</sup>
Cyanobacteria	-	-	-	-	-
TM7	-	-	-	-	-
Others	0	0	0	0	0

“-”代表细菌含量太低。同行字母相同表示差异不显著( $P>0.05$ ),不同表示差异显著( $P<0.05$ ),下同

“-”It means that the bacterial content is too low. The same lowercase letter in the same letter indicated no significant difference ( $P>0.05$ ), different lowercase indicated no significant difference ( $P>0.05$ ). The same as in the following table

2.3.2 大鼠肠道细菌属水平结构分析 将粪便样品中的细菌进一步分化到属水平分析大鼠肠道细菌群落的结构发现,采集的直肠粪便样品中共涉及细菌群落 17 个属。其中未注释菌属 Others、艾克曼菌属 *Akkermansia*、颤螺菌属 *Oscillospira* 和副普雷沃氏菌属 *Paraprevotella* 共 4 个菌属丰度占整体的 80% 以上(表 3)。与空白对照组相比,高脂对照组和 3 个蜂粮剂量组的大鼠肠道中拟杆菌属 *Bacteroides*、粪球菌属 *Coprococcus* 和 *Paraprevotella* 丰度显著下降( $P<0.05$ );高脂对照组大鼠肠道中罗斯氏菌 *Roseburia* 丰度显著下降( $P<0.05$ ),蜂粮低剂量组和中剂量组大鼠肠道中 *Roseburia* 丰度有上升趋势,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与高脂模型组相比,3 个蜂粮组大鼠肠道中 *Akkermansia* 丰度有上升的趋势,但无统计学差异( $P>0.05$ )。

表 3 天然蜂粮对大鼠肠道细菌菌群在属水平的丰度影响( $\bar{X} \pm SE$ )Tab.2 Effect of natural bee beard on abundance of intestinal bacterial flora at family level of rats( $\bar{X} \pm SE$ )

属 Genus	C	M	BL	BM	BH
Others	0.505±0.031 <sup>a</sup>	0.544±0.023 <sup>a</sup>	0.471±0.132 <sup>a</sup>	0.525±0.060 <sup>a</sup>	0.473±0.085 <sup>a</sup>
<i>Akkermansia</i>	0.048±0.028 <sup>a</sup>	0.070±0.065 <sup>a</sup>	0.280±0.151 <sup>a</sup>	0.181±0.005 <sup>a</sup>	0.191±0.113 <sup>a</sup>
<i>Allobaculum</i>	0.008±0.004 <sup>a</sup>	0.004±0.003 <sup>a</sup>	0.003±0.002 <sup>a</sup>	0.014±0.013 <sup>a</sup>	0.010±0.004 <sup>a</sup>
<i>Bacteroides</i>	0.014±0.004 <sup>a</sup>	0.004±0.002 <sup>b</sup>	0.002±0.001 <sup>b</sup>	0.003±0.002 <sup>b</sup>	0.003±0.001 <sup>b</sup>
<i>Coprococcus</i>	0.032±0.008 <sup>a</sup>	0.008±0.003 <sup>b</sup>	0.005±0.001 <sup>b</sup>	0.008±0.003 <sup>b</sup>	0.008±0.003 <sup>b</sup>
<i>Desulfovibrio</i>	0.005±0.003 <sup>a</sup>	0.001±3.624×10 <sup>-4 a</sup>	0.003±0.002 <sup>a</sup>	0.004±0.001 <sup>a</sup>	0.018±0.006 <sup>b</sup>
<i>Lactobacillus</i>	0.013±0.010 <sup>a</sup>	0.004±0.001 <sup>a</sup>	0.009±0.006 <sup>a</sup>	0.039±0.036 <sup>a</sup>	0.006±0.003 <sup>a</sup>
<i>Oscillospira</i>	0.070±0.016 <sup>a</sup>	0.173±0.052 <sup>a</sup>	0.123±0.020 <sup>a</sup>	0.143±0.086 <sup>a</sup>	0.144±0.033 <sup>a</sup>
<i>Parabacteroides</i>	0.006±0.003 <sup>a</sup>	0.019±0.008 <sup>a</sup>	0.012±0.007 <sup>a</sup>	0.006±0.003 <sup>a</sup>	0.011±0.003 <sup>a</sup>
<i>Paraprevotella</i>	0.180±0.055 <sup>a</sup>	0.030±0.010 <sup>b</sup>	0.014±0.009 <sup>b</sup>	0.017±0.016 <sup>b</sup>	0.044±0.027 <sup>b</sup>
<i>Prevotella</i>	0.043±0.010 <sup>ab</sup>	0.087±0.052 <sup>a</sup>	0.018±0.008 <sup>ab</sup>	0.007±0.003 <sup>b</sup>	0.016±0.008 <sup>ab</sup>
rc4-4	0.009±0.002 <sup>a</sup>	0.010±0.003 <sup>a</sup>	0.019±0.006 <sup>a</sup>	0.009±0.005 <sup>a</sup>	0.015±0.002 <sup>a</sup>
<i>Ruminococcus</i>	0.044±0.010 <sup>a</sup>	0.021±0.004 <sup>a</sup>	0.019±0.013 <sup>a</sup>	0.017±0.009 <sup>a</sup>	0.022±0.014 <sup>a</sup>
<i>Sutterella</i>	0.004±0.001 <sup>a</sup>	0.006±0.002 <sup>a</sup>	0.010±0.004 <sup>a</sup>	0.009±0.006 <sup>a</sup>	0.009±0.002 <sup>a</sup>
<i>Dorea</i>	0.016±0.007 <sup>a</sup>	0.001±3.090×10 <sup>-4 b</sup>	0.004±0.004 <sup>ab</sup>	0.006±0.005 <sup>ab</sup>	0.002±0.001 <sup>b</sup>
<i>Roseburia</i>	2.374×10 <sup>-4</sup> ±1.882×10 <sup>-4 a</sup>	0.012±0.004 <sup>b</sup>	0.008±0.004 <sup>ab</sup>	0.011±0.006 <sup>ab</sup>	0.004±0.001 <sup>ab</sup>
<i>Helicobacteraceae</i>	-	-	-	-	-

### 3 结论与讨论

哺乳动物和人体的肠主要分为小肠,大肠和直肠 3 段,主要起到消化食物和吸收营养成分的作用。而上述过程同样依赖肠道微生物群的酵解,这一内源性肠道菌群不仅提供营养,还参与调控上皮细胞活性并且指示先天免疫<sup>[17]</sup>。不同于胃内的强酸性环境,肠道中弱酸性环境更有利于益生菌群的生长,因此肠道可以看成是一个厌氧微生物的“发酵罐”<sup>[18]</sup>。

尽管人体内部存在极其复杂生理生化过程来调节平衡,但是高脂血症的患病率不断上升,这很大程度上是由于当代环境的变化。暴饮暴食和缺乏体育锻炼通常是被认为导致高脂血症的主要原因<sup>[19]</sup>。而这一模式是不完整的,证据表明其它因素也会造成这种慢性“流行病”(感染、表观性遗传学、内分泌物干扰、医源性疾病等)<sup>[20]</sup>。此外,最近的研究证据表明,高脂血症患者体内脂代谢异常会导致肠道菌群紊乱失调,而肠道菌群的失调则会进一步加重机体的高脂血症症状<sup>[21]</sup>。本研究发现,高脂对照组和 3 个蜂粮剂量组大鼠在连续饲喂高脂饲料 60 d 后,较于空白对照组,大鼠肠道中厚壁菌门 Firmicutes 丰度均有增加趋势;增幅分别为 25.93%、8.10%、50.93% 和 11.11%。3 个蜂粮剂量组的拟杆菌门 Bacteroidetes 丰度显著低于空白对照组( $P < 0.05$ ),高脂对照组相较于空白对照组的降幅为 28.29% ( $P > 0.05$ ),这与 Kallus 等<sup>[22]</sup>的研究相一致。导致这两种菌丰度改变的原因可能是拟杆菌门类细菌参与脂质和碳水化合物代谢的酶的基因比厚壁菌门类细菌少<sup>[23]</sup>,而机体在长期摄入大量营养物质后,则需要更多的厚壁菌门细菌来参与代谢。这表明患有高脂血症的大鼠肠道可能受到高脂饮食诱导,自发的改变了肠道菌群结构。蜂粮高剂量组大鼠肠道中变形菌门 Proteobacteria 丰度显著上升( $P < 0.05$ ),而变形菌门含量上升是肠道紊乱的标志<sup>[24]</sup>。此外,蜂粮高剂量组大鼠肠道中软壁菌门 Tenericutes 较蜂粮中剂量组相比显著下降( $P < 0.05$ ),接近高脂模型组水平。这表明高剂量组可能设置过高,对紊乱的肠道菌群结构没有起到有益调节作用。与高脂模型组相比,蜂粮低、中剂量组大鼠肠道中 Firmicutes 丰度有下降趋势( $P > 0.05$ ),降幅分别为 15.70% 和 13.36%。这表明天然蜂粮可能会调控高脂血症大鼠肠道中 Firmicutes 丰度趋于正常水平,但具体调控机制有待进一步研究。蜂粮中剂量组与蜂粮低、高剂量组相比,大鼠肠道中 Firmicutes 却呈上升趋势( $P > 0.05$ ),这可能是大鼠的个体调控能力差异所造成的。

从肠道细菌属水平上来分析,高脂对照组和 3 个蜂粮剂量组大鼠肠道中的菌群丰度呈现显著下降趋势( $P < 0.05$ )。但 3 个蜂粮剂量组大鼠肠道中艾克曼菌属 *Akkermansia* 与高脂对照组相比显示出上升趋势( $P > 0.05$ )。*Akkermansia* 可利用肠道上皮细胞黏膜层中的黏蛋白作为其能量来源,从而通过竞争作用保护肠道免受病原体侵害<sup>[25]</sup>。而 *Akkermansia* 在降解黏蛋白时,会释放出一种重要的短链脂肪酸——乙酸,起到控制体质量的作用<sup>[26]</sup>。研究表明,给小鼠灌胃活的 *Akkermansia* 细菌,能够在不影响食欲的情况下有效预防饮食诱导性肥胖<sup>[27]</sup>。*Akkermansia* 同时也是肠道中最为丰富的黏膜细菌,其丰度降低会导致肠道黏膜层变薄,从而导致肠道屏障功能弱化,使肠道中的有毒有害物质更易侵入人体。患有结肠炎、高脂血症和肥胖症的患者体内 *Akkermansia* 含量会有所降低。而蜂粮中富含的多酚对 *Akkermansia* 具有益生元效应。多酚类物质可以促进肠上皮内层中杯状细胞的分化,产生黏液,从而为 *Akkermansia* 的茁壮成长提供了一个良好环境<sup>[28]</sup>。

综合 Alpha 多样性、肠道细菌门水平和属水平可知,高脂血症大鼠肠道菌群的多样性及丰度均下降。但高脂血症大鼠在灌胃低、中剂量蜂粮后,其部分肠道菌的丰度会发生调整,其能调节导致肥胖的厚壁菌门的丰度趋于正常水平,同时能提高有益菌艾克曼菌属的丰度,其详细分子机理有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 李楠,赵静,吴茹,等.青钱柳多糖对高脂血症小鼠脂代谢及 PPAR $\gamma$ 、ATGL 基因 mRNA 表达的影响[J].中国食品学报,2015,15(9):9-14.

- Li N, Zhao J, Wu R, et al. Research on the influence of *Cyclocarya paliurus* (batal.) iljinskaja polysaccharide on PPAR $\gamma$  and ATGL gene expression in hyperlipidemia mice [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2015, 15(9):9-14.
- [2] Mogensen S S, Schmiegelow K, Grell K, et al. Hyperlipidemia is a risk factor for osteonecrosis in children and young adults with acute lymphoblastic leukemia [J]. *Haematologica*, 2017, 102(5):e175-e178.
- [3] 诸骏仁, 高润霖, 赵水平, 等. 中国成人血脂异常防治指南(2016年修订版) [J]. *中国循环杂志*, 2016, 31(10):937-953.
- Zhu J R, Gao R L, Zhao S P, et al. Guidelines for the prevention and treatment of adult hyperlipidemia in china (2016 Revision) [J]. *Chinese Circulation Journal*, 2016, 31(10):937-953.
- [4] 李艳, 孙珂焕, 白芳, 等. 高脂血症相关疾病发病机制研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2019, 21(4):84-87.
- Li Y, Sun K H, Bai F, et al. Research progress on pathogenic mechanism of hyperlipidemia-related diseases [J]. *Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, 2019, 21(4):84-87.
- [5] 国家卫生和计划生育委员会疾病预防控制局. 中国居民营养与慢性病状况报告(2015年) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
- Disease Prevention and Control Bureau of the State Health and Family Planning Commission. Report on nutrition and chronic diseases of Chinese residents (2015) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2015.
- [6] Ley R E, Peterson D A, Gordon J I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine [J]. *Cell*, 2006, 124(4):837-848.
- [7] Ridaura V K, Faith J J, Rey F E, et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice [J]. *Science*, 2013, 341(6150):124.
- [8] 容祖华, 梁少聪, 路浚齐, 等. 间歇性断食对间歇性断食对老年前期肥胖大鼠肠道菌群及代谢的影响 [J]. *南方医科大学学报*, 2017, 37(4):423-430.
- Rong Z H, Liang S C, Lu J Q, et al. Effect of intermittent fasting on physiology and gut microbiota in presenium rats [J]. *Journal of Southern Medical University*, 2017, 37(4):423-430.
- [9] Stephens R W, Arhire L, Covasa M. Gut microbiota: from microorganisms to metabolic organ influencing obesity [J]. *Obesity*, 2018, 26(5):801-809.
- [10] Huang L, Wen K W, Gao X, et al. Hypolipidemic effect of fucoidan from *Laminaria japonica* in hyperlipidemic rats [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2010, 48, (4):422-426.
- [11] Blazovics A, Lugasi A, Kemeny T, et al. Membrane stabilising effects of natural polyphenols and flavonoids from *Sempervivum tectorum* on hepatic microsomal mixed-function oxidase system in hyperlipidemic rats [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2000, 73(3):479-485.
- [12] Havsteen B H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids [J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2002, 96(2/3):67-202.
- [13] Sobral F, Calhelha R C, Barros L, et al. Flavonoid composition and antitumor activity of bee bread collected in Northeast Portugal [J]. *Molecules*, 2017, 22(2):248.
- [14] 李震, 刘志勇, 江武军, 等. 天然蜂粮对高脂血症大鼠血脂、抗氧化及免疫功能的影响 [J]. *中国农业科学*, 2019, 52(16):2912-2920.
- Li Z, Liu Z Y, Jiang W J, et al. Effects of natural bee bread on blood lipid, antioxidant and immunity in rats with hyperlipidemia [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2019, 52(16):2912-2920.
- [15] 江武军, 吴小波, 刘光楠, 等. 天然蜂粮生产技术研究与应用 [J]. *中国农业科学*, 2017, 50(19):3828-3836.
- Jiang W J, Wu X B, Liu G N, et al. Research and application of production technology of natural honeybee bread [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(19):3828-3836.
- [16] 江武军, 吴小波, 何旭江, 等. 天然蜂粮生产技术及贮存规律研究 [J]. *江西农业大学学报*, 2018, 40(6):1293-1298.
- Jiang W J, Wu X B, He X J, et al. An analysis of laws of storage of natural honeybee bread and its production techniques [J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxie*, 2018, 40(6):1293-1298.
- [17] 王宁, 包艳. 肠道菌群与肥胖发生关系研究进展 [J]. *中国公共卫生*, 2015, 31(7):973-976.

- Wang N, Bao Y. Advance in researches on relationship between gut microbiota and obesity [J]. Chinese Journal of Public Health, 2015, 31(7): 973-976.
- [18] 胡丹丹, 郭婷婷, 李娜, 等. 以 16S rDNA 高通量测序法研究果寡糖对奶牛瘤胃菌群结构及多样性的影响 [J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(10): 2761-2771.
- Hu D D, Guo T T, Li N, et al. Effect of fructooligosaccharide on the structure and diversity of rumen bacterial community in dairy cow by 16S rDNA sequencing technology [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2018, 45(10): 2761-2771.
- [19] Dhurandhar E J, Keith S W. The aetiology of obesity beyond eating more and exercising less [J]. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 2014, 28(4): 533-544.
- [20] McAllister E J, Dhurandhar N V, Keith S W. Ten putative contributors to the obesity epidemic [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2009, 49(10): 868-913.
- [21] 易园骊, 姚萍. 脂代谢与肠道菌群关系的研究进展 [J]. 医学综述, 2013, 19(6): 991-994.
- Yi Y L, Yao P. Research advances in lipid metabolism and intestinal flora [J]. Medical Recapitulate, 2013, 19(6): 991-994.
- [22] Kallus S J, Brandt L J. The intestinal microbiota and obesity [J]. Journal of Clinical Gastroenterology, 2012, 46(1): 16-24.
- [23] Stephens R W, Arhire L, Covasa M. Gut Microbiota: from microorganisms to metabolic organ influencing obesity [J]. Obesity, 2018, 26(5): 801-809.
- [24] Shin N R, Whon T W, Bae J W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota [J]. Trends in Biotechnology, 2015, 33(9): 496-503.
- [25] Belzer C, De Vos W M. Microbes inside—from diversity to function: the case of *Akkermansia* [J]. ISME Journal, 2012, 6(8): 1449.
- [26] Dao M C, Everard A, Aron-Wisnewsky J, et al. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology [J]. Gut, 2016, 65(3): 426-436.
- [27] Everard A, Belzer C, Geurts L, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity [J]. PNAS, 2013, 110(22): 9066-9071.
- [28] Anhê F F, Varin T V, Le B M. Gut microbiota dysbiosis in obesity-linked metabolic diseases and prebiotic potential of polyphenol-rich extracts [J]. Current Obesity Reports, 2015, 4(4): 389-400.