

基于16S rRNA测序技术分析乳源性复合益生菌 对糖尿病小鼠肠道菌群的影响

沈芳¹ 王玉星¹ 迪黛尔·贾尔肯¹ 哈普拉·托留汗² 新华·那比^{1*}

(¹新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830054;

²阿勒泰地区中医医院(阿勒泰地区哈萨克医院)药剂科制剂室, 乌鲁木齐 836499)

摘要 该研究旨在从肠道菌群角度研究乳源性复合益生菌对db/db糖尿病小鼠的作用机理。将32只db/db糖尿病小鼠分为模型组, 阳性药(二甲双胍)组, 复合益生菌高、低剂量组, 8只db/m鼠作为正常对照组。采用ELISA法测定糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin, type A1C, HbA1c)、血清总胆汁酸(total bile acid, TBA)、血清胰高血糖素样肽1(glucagon-like peptide 1, GLP-1)水平, 采用16S rRNA测序技术分析各组小鼠肠道菌群变化情况。结果显示与模型组相比, 高、低剂量复合益生菌均能显著降低HbA1c、血清TBA水平, 升高血清GLP-1水平; 模型组小鼠肠道菌群结构较正常组发生变化, 复合益生菌组小鼠肠道菌群结构较模型组发生变化; 在菌属水平, 模型组Proteobacteria、Enterobacteriaceae等富集, 复合益生菌低剂量组norank_f_Lachnospiraceae、Lachnospiraceae_UCG-006、Butyricicoccus、Anaerotruncus等富集, 复合益生菌高剂量组Escherichia-Shigella、unclassified_f_Eggerthellaceae、Family_XIII_UCG-001富集。复合益生菌可能通过调节糖尿病小鼠肠道菌群失调从而发挥治疗糖尿病的作用, 具体机制有待进一步研究。

关键词 乳源性复合益生菌; 糖尿病; 肠道菌群; 16S rRNA

Analysis of the Effect of Milk Derived Compound Probiotics on Intestinal Flora of Diabetes Mice based on 16S rRNA Sequencing

SHEN Fang¹, WANG Yuxing¹, JIAERKEN Didaier¹, TOLIUIHAN Hapula², NABI Xinhua^{1*}

(¹College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; ²Pharmacy Department Preparation Room, Altay Traditional Chinese Medicine Hospital (Altay Kazakh Medical Hospital), Urumqi 836499, China)

Abstract The purpose of this study was to investigate the mechanism of milk-derived compound probiotics on db/db diabetic mice from the perspective of intestinal flora. Thirty-two db/db diabetic mice were divided into model group, rosiglitazone group, compound probiotics high-dose and low-dose groups, and eight C57BL/KS mice were used as normal control group. HbA1c (glycosylated hemoglobin, type A1C), TBA (total bile acid), GLP-1 (glucagon-like peptide 1) levels were determined by ELISA. 16S rRNA sequencing was used to analyze the changes of intestinal flora in each group. The results showed that compared with the model group, both high-dose and low-dose compound probiotics could significantly reduce HbA1c and serum TBA, and increase serum GLP-1. Compared with the normal group, the intestinal microflora structure of mice in the model group was changed,

收稿日期: 2022-06-30

接受日期: 2022-09-29

国家自然科学基金(批准号: 82260640)和新疆医科大学2022年研究生创新项目(批准号: CXCT2022041)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13579882816, E-mail: 2476320280@qq.com

Received: June 30, 2022

Accepted: September 29, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82260640) and the 2022 Graduate Innovation Project of Xinjiang Medical University (Grant No.CXCT2022041)

*Corresponding author. Tel: +86-13579882816, E-mail: 2476320280@qq.com

and the structure of intestinal flora in the compound probiotic group was changed compared with that in the model group. At the genus level, *Proteobacteria* and *Enterobacteriaceae* in the model group are enriched. In low dose group *norank_f_Lachnospiraceae*, *Lachnospiraceae_UCG-006*, *Butyricicoccus* and *Anaerotruncus* are enriched. In compound probiotics high dose group, *Escherichia-Shigella*, *Unclassified_f_Eggerthellaceae*, and *Family_XIII_UCG-001* were enriched. Compound probiotics may play a role in the treatment of diabetes by regulating intestinal microflora imbalance in diabetic mice. The specific mechanism needs to be further studied.

Keywords milk-derived compound probiotics; diabetes; intestinal flora; 16S rRNA

糖尿病(diabetes)是一种常见的慢性代谢性疾病,主要表现为持续性的高血糖和长期代谢紊乱^[1]。最新报告显示,2021年全球约有5.37亿成年人患有糖尿病,预计到2030年,该数字将会上升到6.43亿^[2]。糖尿病已严重威胁人类健康。研究发现,肠道菌群与糖尿病的发生发展密切相关,维持肠道菌群稳态对治疗糖尿病有积极作用^[3]。益生菌是一种摄入适量会对宿主健康产生有益作用的活性微生物^[4],研究表明,益生菌可以通过定植肠道,调节肠道菌群结构和机体免疫,改善糖脂代谢^[5]。本研究所用14种益生菌均从新疆北部牧场发酵驼乳中提取,并经中国农业科学院微生物研究所鉴定。课题组前期研究发现,这14种益生菌具有良好的耐酸、耐胆盐等益生特性^[6],具有调节免疫、改善糖尿病小鼠糖脂代谢、调节肠道菌群结构的功能^[7-8],但其对肠道菌群具体菌属的影响仍不清楚。本研究通过检测db/db鼠糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin, type A1c, HbA1c)、血清总胆汁酸(total bile acid, TBA)、血清胰高血糖素样肽1(glucagon-like peptide 1, GLP-1)水平,进一步研究复合益生菌对糖尿病小鼠肠道菌群的影响,从肠道菌群角度初步探讨复合益生菌改善糖尿病小鼠血糖水平的机制。

1 材料与方法

1.1 菌株来源及培养

本研究中乳源性复合益生菌是从新疆驼乳中提取的10种乳酸菌和4种酵母菌,已由中国农业科学院微生物研究所鉴定,分别为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、副干酪乳杆菌(*Lactobacillus Paracasei*)、高加索乳杆菌(*Lactobacillus caucasicus*)、乳酸乳杆菌(*Lactobacillus lactis*)等。10株乳酸菌于37℃、MRS(Man Rogosa Sharpe)肉汤中培养48 h, 4株酵母菌于37℃、麦芽汁肉汤中培养48 h。高剂量复合益生菌包含 1.0×10^{10} CFU/mL乳酸菌+ 1.0×10^8 CFU/mL酵母

菌,低剂量复合益生菌包括 1.0×10^8 CFU/mL乳酸菌+ 1.0×10^6 CFU/mL酵母菌。

1.2 实验动物及分组

32只db/db鼠、8只db/m鼠均由常州卡文斯实验动物有限公司提供,db/db小鼠体质量为 (30 ± 5) g, db/m小鼠体质量为 (20 ± 5) g,生产和使用许可证号为SCXK(苏)2016-0010。本实验由新疆医科大学实验动物伦理委员会审批通过,伦理审查批号为IACUC-20211014-8。将32只db/db鼠分为模型组、阳性药(二甲双胍)组、复合益生菌低剂量组、复合益生菌高剂量组,8只db/m鼠作为正常对照组。正常组灌胃生理盐水(0.4 mL/d)6周,模型组灌胃生理盐水(0.4 mL/d)6周,阳性药组灌胃二甲双胍(6 mg·kg⁻¹·d⁻¹)6周,复合益生菌低剂量组灌胃乳酸菌 1.0×10^8 CFU/d+酵母菌 1.0×10^6 CFU/d,复合益生菌高剂量组灌胃乳酸菌 1.0×10^{10} CFU/d+酵母菌 1.0×10^8 CFU/d,所有小鼠于上午11时进行干预,持续6周。饲养环境为SPF级,每日光照12 h,光照强度为200 lx,温度为 (23 ± 1) ℃,相对湿度为 $(50 \pm 5)\%$ 。

1.3 材料与仪器

二甲双胍片购于中美上海施贵宝制药有限公司;小鼠HbA1c ELISA试剂盒、小鼠TBA ELISA试剂盒、小鼠GLP-1 ELISA试剂盒均购于上海酶连生物科技有限公司;DNA Marker购于美国Thermo-Fisher公司;酶标仪、核酸蛋白检测仪、实时荧光定量PCR仪均购于美国Bio-Rad公司;肠道微生物分析于Miseq 300测序平台进行。

1.4 HbA1c含量检测

于实验的最后1天,将小鼠以摘除眼球的方式取血,再将血样放置于离心管中,于低温高速(4 ℃、 $3\ 000$ r/min)离心15 min后收集血清。按ELISA试剂盒说明书检测血中HbA1c含量:将标准品和样品稀释,各取100 μL加于孔板,于37℃孵育120 min;用洗涤液将反应板充分洗涤4~6次,在滤纸上印干;加入100 μL抗体工作液(浓度为10 μg/mL),将反应板充分混匀后

于37 °C放置60 min; 甩去孔内液体, 用洗涤液将反应板充分洗涤4~6次后, 在滤纸上印干; 最后加入100 μ L终止液, 使用酶标仪在450 nm波长处检测吸光度值, 根据吸光度值计算各组HbA1c含量。每组检测5个样本, 测量结果取平均值。

1.5 血清总胆汁酸含量检测

收集血清, 采用ELISA试剂盒测定血清中总胆汁酸含量: 将标准品和样品稀释后, 各取50 μ L加于孔板中, 之后加生物素抗体50 μ L(浓度为10 μ g/mL), 于37 °C孵育60 min; 甩去孔内液体, 加入洗涤液将反应板充分洗涤3次; 加入80 μ L亲和链酶素-辣根过氧化物酶, 混匀后于37 °C孵育30 min; 甩去孔内液体, 加入洗涤液将反应板充分洗涤3次; 加入50 μ L底物工作液, 混匀后于37 °C孵育10 min; 最后加入50 μ L终止液, 使用酶标仪在450 nm波长处检测吸光度值, 根据吸光度值计算各组血清TBA含量。每组检测5个样本, 测量结果取平均值。

1.6 血清GLP-1含量检测

将一部分血样置于干燥肝素试管中, 用于GLP-1水平的检测, 迅速加入20 μ L二肽基肽酶4(di-peptidyl peptidase 4, DPP4)抑制剂, 3 000 r/min离心15 min后收集血清, 采用ELISA试剂盒测定血清中GLP-1含量: 将标准品和样品稀释, 各取100 μ L加于孔板, 于37 °C孵育120 min; 甩去孔内液体, 用洗涤液将反应板充分洗涤4次后, 在滤纸上印干; 加入100 μ L抗体工作液(浓度为10 μ g/mL), 混匀后于37 °C放置60 min; 甩去孔内液体, 用洗涤液将反应板充分洗涤4~6次后, 在滤纸上印干; 最后加入100 μ L终止液, 使用酶标仪在450 nm波长处检测吸光度值, 根据吸光度值计算各组血清GLP-1含量。每组检测5个样本, 测量结果取平均值。

1.7 肠道内容物多样性检测

在清洁环境中采集小鼠肠道内容物于无菌冻存管中, 于-80 °C保存待检; 各组小鼠收集3份肠道内容物, 将样本中的DNA进行抽提和质检; 选取细菌的16S rRNA基因中高度可变的V3-V4区进行PCR扩增, 长度约468 bp, 上游引物338F(5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'), 下游引物806R(5'-GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT-3'), 进行PCR纯化、定量后, 按照检测要求将样本进行均一化混匀; 进行Miseq文库的构建, 并在Miseq PE300平台上进行高通量测序。

1.8 生物信息学分析

将测序后的序列使用Flash(<https://ccb.jhu.edu/software/FLASH/index.shtml>, version:1.2.11)进行首尾(pair-end)双端序列拼接, 使用Fastp(<https://github.com/OpenGene/fastp>, version: 0.19.6)对原始测序序列进行质控和过滤, 同时根据序列首尾两端的barcode和引物序列区分样品得到有效序列, 并校正序列方向, 得到优化序列。利用Upase(<http://www.drive5.com/uparse/>, version:7.0.1090)软件根据97%的相似度对序列进行分类操作单元(operational taxonomic unit, OTU)聚类, 将获得的OTUs与SILVA数据库(<https://www.arb-silva.de/>, version:138)进行检索和比较, 利用RDP Classifier(<https://sourceforge.net/projects/rdp-classifier/>, version:2.11)进行OTU的分类和注释。再依次进行多样性、物种构成、多级物种差异判别(linear discriminant analysis effect size, LEfSe)、功能注释(clusters of orthologous groups, COG)等分析。

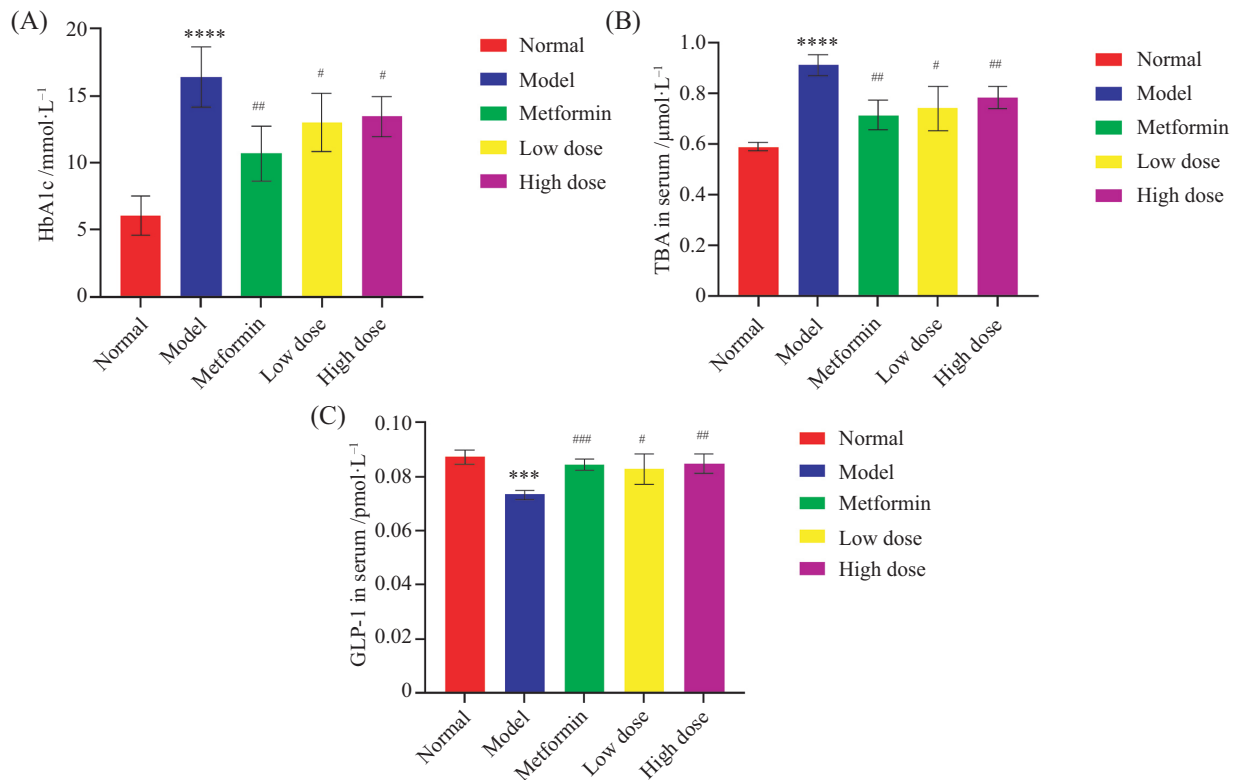
1.9 统计学方法

采用GraphPad Prism 9.3.1和R语言软件。正态分布的连续变量以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两组之间比较采用 t 检验, 多组之间比较采用ANOVA方差分析; 非正态分布的连续变量以中位数(四分位数)表示, 两组之间比较采用非参数检验, 多组之间比较采用Kruskal-Wallis秩和检验。检验水准 $\alpha=0.05$, 以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 复合益生菌对糖尿病小鼠HbA1c、血清总胆汁酸、血清GLP-1水平的影响

如图1A所示, 干预6周后, 相较于正常组, 模型组HbA1c水平明显增高($P<0.0001$, $t=-9.457$)。相较于模型组, 阳性药组、复合益生菌组HbA1c水平显著降低($P<0.01$; $P<0.05$; $P<0.05$), 说明复合益生菌可显著改善糖尿病小鼠的血糖水平; 如图1B所示, 干预6周后, 相较于正常组, 模型组小鼠血清TBA含量显著升高($P<0.001$); 相较于模型组, 阳性药组、复合益生菌高、低剂量组均不同程度地降低血清TBA含量, 差异均具有统计学意义($P<0.01$; $P<0.05$; $P<0.01$), 说明复合益生菌可降低病小鼠血清TBA含量; 如图1C所示, 干预6周后, 相较于正常组, 模型组小鼠血清GLP-1水平显著升高, 差异具有统计学意义。



A: 复合益生菌对db/db小鼠HbA1c的影响; B: 复合益生菌对db/db小鼠血清总胆汁酸的影响; C: 复合益生菌对db/db小鼠血清GLP-1的影响。*** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, 与正常组比较; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$, 与模型组比较。

A: the effect of compound probiotics on HbA1c in db/db mice; B: the effect of compound probiotics on serum total bile acids in db/db mice; C: the effect of compound probiotics on serum GLP-1 in db/db mice. *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ compared with normal group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ compared with model group.

图1 复合益生菌对db/db小鼠HbA1c、血清总胆汁酸、血清GLP-1水平的影响

Fig.1 Effects of compound probiotics on HbA1c, serum total bile acid and serum GLP-1 levels in db/db mice

义($P<0.001$);相较于模型组, 阳性药组、复合益生菌高、低剂量组血清GLP-1水平均有不同程度的升高, 差异均具有统计学意义($P<0.001$; $P<0.01$; $P<0.05$), 说明复合益生菌在一定程度上可升高血清GLP-1水平。

2.2 肠道微生物多样性分析

Shannon、Simpson指数用于反映样本中物种多样性, 属于Alpha多样性指数, 其中Shannon指数越大, 说明群落多样性越高, Simpson指数越大, 说明群落多样性越低。相较于正常组, 模型组, 阳性药组, 复合益生菌高、低剂量组Shannon指数均升高, 其中低剂量组升高明显, 高剂量组该指数水平低于模型组(图2A); 模型组、阳性药组、复合益生菌低剂量组Simpson指数均低于正常组, 其中低剂量组降低明显, 高剂量组该指数水平高于正常组(图2B)。说明db/db小鼠肠道菌群多样性较正常小鼠高, 低剂量复合益生菌能增加db/db小鼠肠道菌群多样性, 高剂量复合益生菌则降低db/db小鼠肠道菌群多样性。

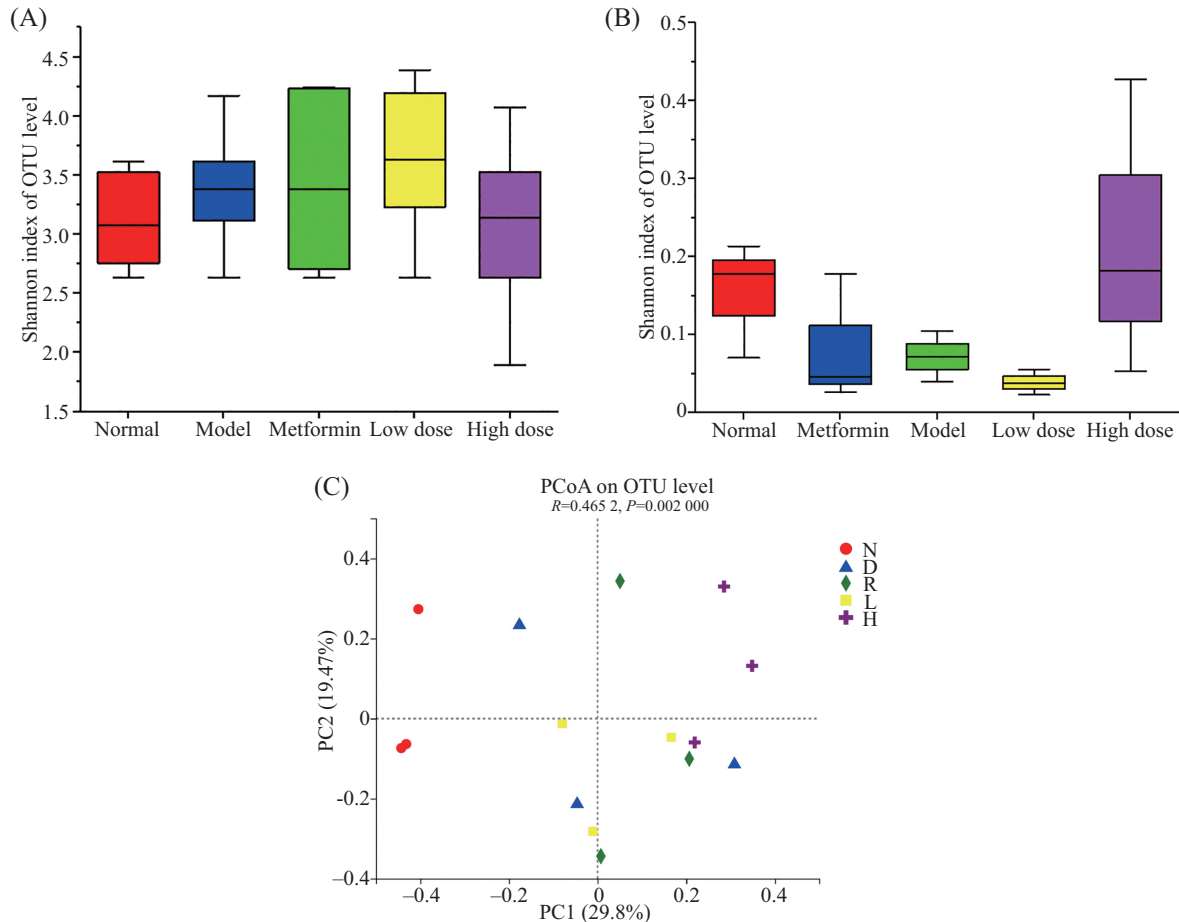
PCoA(主坐标分析)用于描述样本间的相似程度和差异性, 属于Beta多样性常用的分析方法。如图2C所示, 模型组、阳性药组、复合益生菌高、低剂量组分布较为分散, 各组样本之间距离大于正常组, 说明相较于正常组, 其他各组的个体差异较大, 肠道菌群的进化相似性较小。与模型组相比, 复合益生菌高、低剂量组的分布更为集中, 且各组样本之间的距离也比模型组小, 说明给予复合益生菌可以提高db/db小鼠肠道菌群的进化相似性。

2.3 物种构成

对优化序列进行OTU聚类, 发现各组在门、属水平的构成相似。主要的门水平物种为Firmicutes、Bacteroidota、Desulfobacterota、Actinobacteriota、Patescibacteria、Proteobacteria等, 主要的属水平物种为Lactobacillus、norank_f_Muribaculaceae、Desulfovibrio、unclassified_f_Lachnospiraceae、Lachnospiraceae_NK4A136_group等。

2.4 组间LEfSe分析

通过预设LDA值>2.5寻找各组的差异菌属。如



A: 各组小鼠样本菌群Alpha多样性Shannon指数; B: 各组小鼠样本菌群Alpha多样性Simpson指数; C: 各组小鼠肠道菌群Beta多样性PCoA图。N: 正常组; D: 模型组; R: 阳性药组; L: 复合益生菌低剂量组; H: 复合益生菌高剂量组。

A: Shannon index of Alpha diversity of microbiota in each group; B: Simpson index of Alpha diversity of microbiota in each group; C: PCoA diagram of Beta diversity of intestinal microbiota in mice of each group. N: normal group group; D: model group; R: metformin group; L: low dose group of compound probiotics group; H: compound probiotics high dose group.

图2 各组多样性指数分析

Fig.2 Diversity index analysis of each group

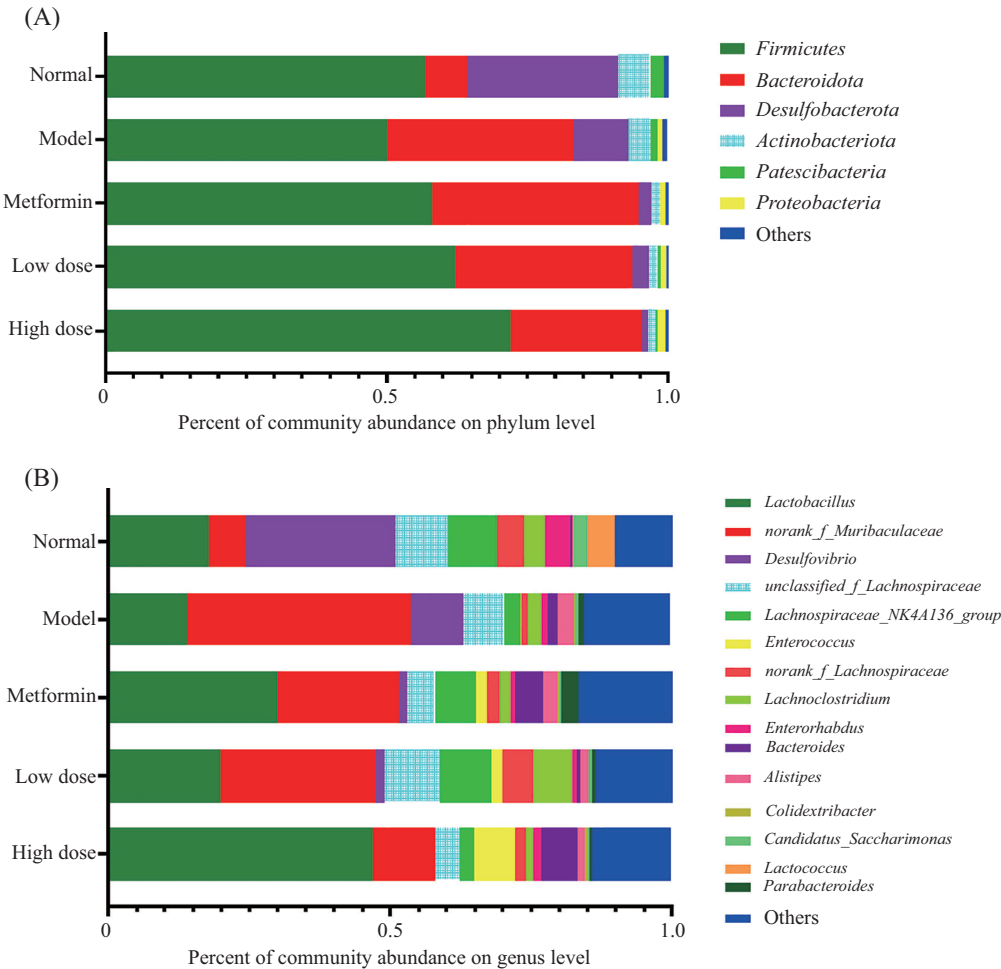
图4A~图4D所示, 与正常组比较, 模型组*Proteobacteria*、*Enterobacteriaceae*等丰度较高; 相较于模型组, 阳性药组*Butyricicoccus*丰度增加, 复合益生菌低剂量组*norank_f_Lachnospiraceae*、*Lachnospiraceae*、*UCG-006*、*Escherichia-Shigella*、*Butyricicoccus*、*Anaerotruncus*、*Eubacterium_xylanophilum_group*、*A2*等丰度增加, 复合益生菌高剂量组*Escherichia-Shigella*、*unclassified_f_Eggerthellaceae*、*Family_XIII_UCG-001*丰度增加。

3 讨论

3.1 复合益生菌对db/db小鼠血糖水平的可能机制

研究发现, 益生菌的摄入可有效控制糖尿病患者血糖水平^[9]。本研究结果也揭示了这一点, 模型

组较正常组HbA1c水平明显升高, 经过复合益生菌干预后, HbA1c水平显著下降。GLP-1是一种肠促胰岛素, 在2型糖尿病的发生发展中发挥着重要作用, 主要作用于胰岛β细胞, 促进胰岛素的分泌, 降低胰高血糖素的分泌, 改善胰岛β细胞功能, 调节血糖水平。YADAV等^[10]研究发现, 益生菌可通过调节肠道菌群-短链脂肪酸轴促进GLP-1分泌, 进而改善HFD模型小鼠和ob/ob瘦素缺陷型小鼠的胰岛素抵抗和调节血糖水平。本研究发现, 相较于正常组。模型组血清GLP-1含量显著降低, 复合益生菌干预后, db/db小鼠血清GLP-1含量显著增加, 与YADAV等^[10]研究结果一致, 说明复合益生菌调节血糖的机制可能是通过GLP-1释放来实现的。GLP-1的释放受短链脂肪酸和胆汁酸的调节, 其中胆汁酸可通过激活FXR/



A: 各组门水平物种组成; B: 各组属水平物种组成。
A: species composition at phylum level in each group; B: species composition at genus level in each group.

图3 门水平及属水平物种组成

Fig.3 Species composition of phylum level and genus level

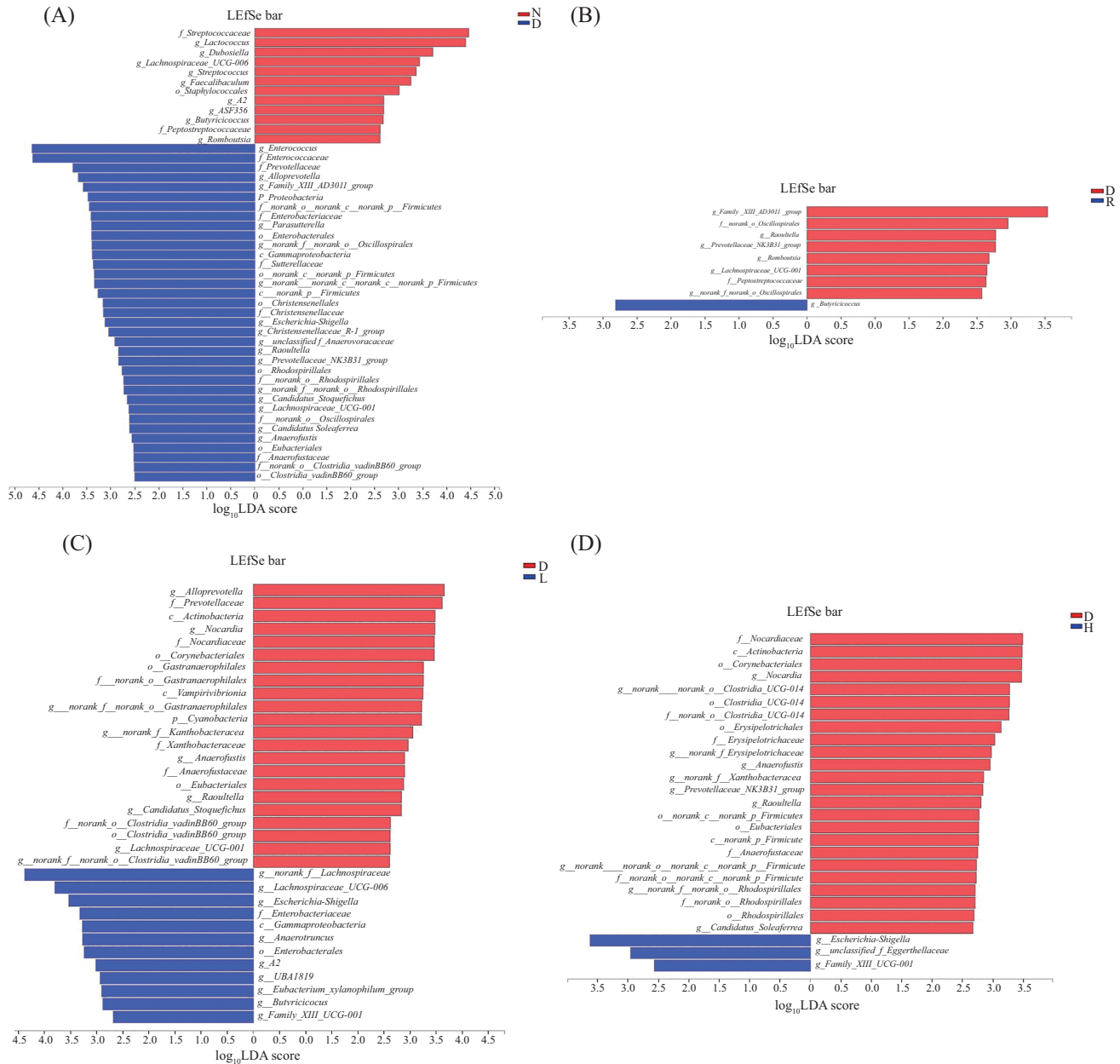
TGR5刺激GLP-1分泌。已有研究表明, 益生菌可通过FXR增加胆汁酸排泄^[11]。循环胆汁酸的排泄促进胆汁酸合成, 增加能量消耗和胰岛素分泌, 调节血糖水平^[12]。本研究结果显示, 相较于正常组, 模型组血清TBA水平显著增加, 经复合益生菌干预后, 血清TBA水平明显下降, 说明复合益生菌能促进db/db小鼠循环胆汁酸排泄, 这可能是复合益生菌调节血糖的另一机制。

3.2 复合益生菌对糖尿病小鼠肠道菌群的影响

肠道内大约有10万亿个微生物^[6], 彼此相互依存、相互制约, 共同调节宿主的健康。当肠道菌群失衡, 肠道屏障功能减弱, 致病菌增加, 导致代谢紊乱, 进而诱发肥胖、糖尿病等代谢性疾病^[7]。有研究表明, 益生菌可通过改变肠道菌群结构改善肥胖、糖尿病等代谢性疾病^[13]。本研究发现, 相较于正常

小鼠, db/db小鼠肠道菌群Alpha多样性升高。这一结果与之前的研究一致, 给予复合益生菌后, db/db小鼠肠道菌群Alpha多样性发生改变, 相较于模型组和复合益生菌高剂量组, 复合益生菌低剂量组Alpha多样性升高, 说明复合益生菌可以改变db/db小鼠肠道菌群多样性。PCoA分析也证实了这一结果, 模型组肠道菌群结构个体差异大, 进化相似性较低, 补充复合益生菌之后, 肠道菌群结构个体差异减小, 进化相似性提高。

研究发现, 益生菌对肠道菌群结构具有调节作用, 可以改善由于糖尿病所带来的肠道菌群紊乱^[14]。本研究结果显示, 相较于正常组, 模型组 *Proteobacteria*、*Enterbacteriaceae*丰度增加, *Proteobacteria*、*Enterbacteriaceae*均属于革兰氏阴性菌, 可分泌脂多糖, 诱导炎症的发生和胰岛素抵抗^[15-16], 其



A: 正常组与模型组肠道菌群LDA条形图; B: 模型组与阳性药组肠道菌群LDA条形图; C: 模型组与复合益生菌低剂量组肠道菌群LDA条形图; D: 模型组与复合益生菌高剂量组肠道菌群LDA条形图。N: 正常组; D: 模型组; R: 阳性药组; L: 复合益生菌低剂量组; H: 复合益生菌高剂量组。
A: LDA bar chart of intestinal microbiota in normal group and model group; B: LDA bar chart of intestinal microbiota in model group and positive drug group; C: LDA bars of intestinal microbiota in model group and compound probiotic low-dose group; D: LDA bars of intestinal microbiota in model group and compound probiotics high-dose group. N: normal group group; D: model group; R: metformin group; L: low dose group of compound probiotics group; H: compound probiotics high dose group.

图4 组间差异物种分析

Fig.4 Analysis of different species between groups

中*Proteobacteria*可作为肠道菌群紊乱的诊断标志物^[17]。LAMBETH等^[18]通过对2型糖尿病患者粪便DNA样品中的细菌群落组成和多样性进行的研究,发现*Proteobacteria*、*Enterbacteriaceae*在2型糖尿病患者体内显著增加,本研究与该研究结果一致,说明糖尿病导致小鼠肠道菌群紊乱,致病菌富集。复

合益生菌干预后,肠道菌群结构发生变化,低剂量组 *norank_f_Lachnospiraceae*、*Lachnospiraceae* UCG-006、*Escherichia-Shigella*、*Butyricoccus*、*Anaerotruncus*、*Eubacterium_xylanophilum_group*、*A2*丰度增加,高剂量组 *Escherichia-Shigella*、*unclassified_f_Eggerthellaceae*、*Family_XIII_UCG-001*丰

度增加, 其中 *Anaerotruncus*、*Eubacterium_xylanophilum_group*、*A2* 与丁酸的产生有关, *Lachnospiraceae_UCG-006* 与盲肠短链脂肪酸的产生呈正相关^[19], *Butyricicoccus* 不仅是一种产丁酸菌(丁酸是短链脂肪酸的一种)^[20], 而且与胆汁酸在肠道中的代谢相关, LI 等^[21] 发现益生菌的联合使用导致 CDI 患者肠道中 *Butyricicoccus* 显著增加, 进一步研究发现 *Butyricicoccus* 与初级胆汁酸呈负相关, 与次级胆汁酸呈正相关。

由于肠道菌群数量庞大且结构复杂, 其变化差异不仅会受到饮食、年龄等影响, 实验环境和操作方法也是导致差异产生的因素。

4 结论

总之, 我们发现补充复合益生菌能显著改善 db/db 小鼠的空腹血糖, 这可能与复合益生菌能促进血清 GLP-1 释放和增加循环胆汁酸排泄相关, 为了进一步了解益生菌在改善糖尿病中的作用, 我们通过 16S rRNA 测序对 db/db 小鼠肠道菌群进行分析, 发现模型组肠道菌群多样性升高并且个体差异性大, 肠道菌群进化相似性低, 致病菌富集; 复合益生菌干预后, 多样性发生不同程度的变化, 主要表现为低剂量组多样性指数升高, 高剂量组多样性指数降低, 肠道菌群进化相似性升高, 肠道菌群结构发生变化, 主要表现为与短链脂肪酸和胆汁酸代谢相关的菌属丰度增加。综上所述, 本研究结果显示, 复合益生菌可能通过调节肠道菌群结构, 发挥调节血糖、改善糖尿病的作用。

参考文献 (References)

- [1] FRIEDMAN D N, TONORES E S, COHEN P. Diabetes and metabolic syndrome in survivors of childhood cancer [J]. *Horm Res Paediatr*, 2019, 91(2): 118-27.
- [2] CHO N H, SHAW J E, KARURANGA S, et al. IDF diabetes atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2018, 138: 271-81.
- [3] LYNCH S V, PEDERSEN O. The human intestinal microbiome in health and disease [J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(24): 2369-79.
- [4] HILL C, GUARNER F, REID G, et al. Expert consensus document. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2014, 11(8): 506-14.
- [5] 马腾, 杨妮, 孙志宏, 等. 益生菌: 代谢性疾病调控新靶向[J]. 科学通报 (MA T, YANG N, SUN Z H, et al. Probiotics: a new target for metabolic disease regulation [J]. *Chinese Science Bulletin*), 2021, 66(27): 3604-16.
- [6] 迪娜热尔·迪力达西, 刘璐, 加勒哈斯别克·塞力克, 等. 新疆传统发酵乳品中乳酸菌与酵母菌的益生特性[J]. *中国微生物生态学杂志* (DILIDAXI D, LIU L, SAILIKE J, et al. Probiotics characteristics of the lactic acid bacteria and yeasts in Xinjiang traditional fermented dairy product [J]. *Chinese Journal of Microecology*), 2018, 30(1): 5-9, 13.
- [7] WANG Y, WU Y, SAILIKE J, et al. Fourteen composite probiotics alleviate type 2 diabetes through modulating gut microbiota and modifying M1/M2 phenotype macrophage in db/db mice [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 161: 105150.
- [8] MANAER T, YU L, NABI X H, et al. The beneficial effects of the composite probiotics from camel milk on glucose and lipid metabolism, liver and renal function and gut microbiota in db/db mice [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2021, 21(1): 127.
- [9] KOUTNIKOVA H, GENSER B, MONTEIRO-SEPULVEDA M, et al. Impact of bacterial probiotics on obesity, diabetes and non-alcoholic fatty liver disease related variables: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials [J]. *BMJ Open*, 2019, 9(3): e017995.
- [10] YADAV H, LEE J H, LLOYD J, et al. Beneficial metabolic effects of a probiotic via butyrate-induced GLP-1 hormone secretion [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(35): 25088-97.
- [11] LIU Y, CHEN K, LI F, et al. Probiotic lactobacillus rhamnosus GG prevents liver fibrosis through inhibiting hepatic bile acid synthesis and enhancing bile acid excretion in mice [J]. *Hepatology*, 2020, 71(6): 2050-66.
- [12] WATANABE M, MORIMOTO K, HOUTEN S M, et al. Bile acid binding resin improves metabolic control through the induction of energy expenditure [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e38286.
- [13] GOMES A C, BUENO A A, DE SOUZA R G, et al. Gut microbiota, probiotics and diabetes [J]. *Nutr J*, 2017, 13: 60.
- [14] SALGAO M K, OLIVEIRA L G S, COSTA G N, et al. Relationship between gut microbiota, probiotics, and type 2 diabetes mellitus [J]. *Applied Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(4): 1-10.
- [15] ZHANG Z, TIAN T, CHEN Z, et al. Characteristics of the gut microbiome in patients with prediabetes and type 2 diabetes [J]. *PeerJ*, 2021, 9: e10952.
- [16] CHEN Q, MA X, LI C, et al. Enteric phageome alterations in patients with type 2 diabetes [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 10: 575084.
- [17] SHIN N R, WHON T W, BAE J W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota [J]. *Trends Biotechnol*, 2015, 33(9): 496-503.
- [18] LAMBETH S M, CARSON T, LOWE J, et al. Composition, diversity and abundance of gut microbiome in prediabetes and type 2 diabetes [J]. *J Diabetes Obes*, 2015, 2(3): 1-7.
- [19] GUO W, XIANG Q, MAO B, et al. Protective effects of microbiome-derived inosine on lipopolysaccharide-induced acute liver damage and inflammation in mice via mediating the TLR4/NF- κ B pathway [J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(27): 7619-28.
- [20] ZHU C, SAWREY-KUBICEK L, BEALS E, et al. Human gut microbiome composition and tryptophan metabolites were changed differently by fast food and Mediterranean diet in 4 days: a pilot study [J]. *Nutr Res*, 2020, 77: 62-72.
- [21] LI X, CHU Q, HUANG Y, et al. Consortium of probiotics attenuates colonization of *Clostridioides difficile* [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 2871.