

柠檬酸钠对小鼠生理及肠道菌群的影响

Effect of sodium citrate on physiological properties and composition of intestinal microbiota of mice

张宁 李东尧 张秋香 张灏 陈卫

ZHANG Ning LI Dong-yao ZHANG Qiu-xiang ZHANG Hao CHEN Wei

(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

(Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

摘要: 研究添加剂柠檬酸钠对小鼠的生长、血清生化指标及肠道菌群的影响。小鼠随机分为空白组、低剂量组(添加量 0.65%)、中剂量组(添加量 2.6%)和高剂量组(添加量 5.2%), 分别连续膳食干预 4 周, 于不同时间点采集各组小鼠粪便样品并记录体重、采食量等数据; 试验结束后对小鼠血清生化指标和肠道菌群进行分析, 结果表明: 柠檬酸钠组小鼠体重均低于空白组, 且高剂量组小鼠的血清高密度脂蛋白胆固醇含量显著增高($P < 0.05$)。柠檬酸钠的添加影响了小鼠肠道微生物的 β 多样性, 使厚壁菌门和拟杆菌门的比例发生变化。在属水平上, 柠檬酸钠高剂量组检测出了棒状杆菌属和葡萄球菌属, 说明摄食高剂量的柠檬酸钠会对小鼠肠道微生态造成一定影响。

关键词: 柠檬酸钠; 肠道微生物; 高通量测序

Abstract: Effects of sodium citrate were investigated on the growth, the serum biochemical parameters and intestinal flora of mice. Mice were randomly divided into four groups: control group, low-dose group (added 0.65% sodium citrate), middle-dose group (added 2.6% sodium citrate) and high-dose group (added 5.2% sodium citrate). The diet intervention lasted for four weeks. Stool samples and weight data were collected weekly, and the composition of intestinal microbiota and the serum biochemical parameters were determined at the end of the fourth week. Results showed that the addition of sodium citrate made the body weight of mice less than control group. And the high-dose group's high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) had a significantly increased. The β diversity and the ratio of Firmicutes to Bacteroidetes were changed by intake of sodium citrate. At the genus level, *Corynebacterium* and *Staphylococcus* were detected in the high-dose group. Results indicated that the intestinal flora of mice could be

affected by intake of high dose of sodium citrate.

Keywords: sodium citrate; intestinal microflora; high-throughput sequencing

人体肠道中栖生着大量微生物, 成人肠道内的微生物数量高达 10^{14} g^{-1} 。肠道内容物, 接近人体体细胞数量的 10 倍^[1]。这些数量庞大、种类繁多的微生物不仅能够实现自身物质和信息的交换, 而且能够与宿主细胞不断进行信息与能量交流, 参与宿主代谢, 生理性地调控重要化学物质的转化^[2]。健康成人的肠道菌群处于相对稳定的动态平衡中, 但很容易受到诸如饮食、生活方式、疾病和抗生素使用等因素的影响^[3-4]。其中饮食是肠道菌群变迁的重要因素之一, 也是最容易改变和控制的因子。研究表明, 在影响肠道菌群物种丰度的决定因素中, 饮食因素比基因型更为重要^[5], 且最快 24 h 内即可改变肠道菌群的组成^[6]。

在人们的日常饮食中, 食品添加剂是食品中的一类重要物质。其中, 柠檬酸钠作为一种常用的添加剂, 具有 pH 调节性能及良好的溶解性和稳定性, 主要用作调味剂、缓冲剂和稳定剂等^[7]。另外, 柠檬酸钠同柠檬酸配伍, 可用作各种果酱、果汁、奶制品和糕点等的胶凝剂、营养增补剂及风味剂等^[8]。GB 2760—2014 中规定柠檬酸钠的最大使用量为“按生产需要适量使用”。目前, 有研究^[9]发现柠檬酸钠可与其它有机酸复配添加入畜牧类动物饲料中, 发挥饲料酸化剂的作用, 提高畜牧类动物的生产性能, 而关于柠檬酸钠对肠道微生物的影响还没有系统全面的研究。因此, 本研究拟通过动物试验探究食品添加剂柠檬酸钠对小鼠生理及肠道微生物的影响, 以为消费者对柠檬酸及其钠盐的适量摄入提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 材料与amp;仪器

柠檬酸钠: 分析纯, 国药集团化学试剂公司;

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(编号: 3120691); 十二五国家科技支撑计划项目(编号: 2013BAD18B01)

作者简介: 张宁, 女, 江南大学在读硕士研究生。

通讯作者: 陈卫(1966—), 男, 江南大学教授, 博士。

E-mail: chenwei66@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2016-01-14

基础饲料:营养成分为水分 $\leq 10\%$,粗蛋白 $\geq 20\%$,粗脂肪 $\geq 4\%$,粗纤维 $\leq 5\%$,灰分 $\leq 8\%$,钙 $1.0\% \sim 1.8\%$,磷 $0.6\% \sim 1.2\%$,氨基酸 $\geq 1.1\%$,上海市斯莱克实验动物有限公司;

土壤核酸提取试剂盒:美国 MP 公司;

胶回收试剂盒:德国 Qiagen 公司;

全自动生化分析仪:BS-480 型,深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司;

超低温冰箱:902-ULTS 型,美国 Thermo Scientific 公司;

Miseq 测序仪:Miseq 型,美国 Illumina 公司;

快速核酸提取仪:FastPrep-24 型,美国 MP 公司;

PCR 仪:T100 thermal cycler 型,美国 Bio-Rad 公司;

酶标仪:SpectraMax M5 型,美国 Molecular Devices 公司。

1.1.2 试验动物

雄性 Balb/c 小鼠,清洁级,7 周龄,苏州苏普思实验动物公司,自由饮食饮水,12 h 交替照明。

1.2 方法

1.2.1 柠檬酸钠添加量的确定及含柠檬酸钠饲料的制作 柠檬酸钠的添加量是根据人与小鼠之间的等效剂量进行换算的^[10]。假设某人(60 kg)每日饮用 500 g 饮料(柠檬酸钠含量 1.0%),则每日摄入柠檬酸钠 83.33 mg/kg·体重。小鼠每日可摄取柠檬酸钠 83.33×12.3 (人与小鼠等效剂量的换算系数)=1 025 mg/kg·体重,则 20 g 小鼠每日摄取柠檬酸钠 20.5 mg,以此为标准设置试验的低剂量组即柠檬酸钠添加量为 0.65%,中剂量和高剂量组分别为低剂量组的 4 倍(添加量 2.6%)和 8 倍(添加量 5.2%)。

将基础饲料打碎后,按不同添加量混入柠檬酸钠,加入适量的水,混匀。将混匀的饲料移至颗粒成型机造粒成型,真空包装后于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.2 动物试验设计 小鼠适应 1 周后,饲喂含柠檬酸钠的饲料,自由进食进水。小鼠随机分为空白组和柠檬酸钠低、中、高剂量组,每组 6 只。膳食干预期间,每天定时称量小鼠剩余饲料量,每周定时称量小鼠体重。收集膳食干预前(0 周),干预 2 周及干预 4 周时的小鼠粪便,于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存。

1.2.3 小鼠血清生化指标的检测 试验结束后,小鼠眼球取血于清洁的 1.5 mL 离心管中,室温静置 4 h 后离心(3 000 r/min,15 min),血清转移到新的离心管中, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存。测定前 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下融化,于全自动生化分析仪中测定相关生化指标。

1.2.4 小鼠粪便样品总 DNA 的提取 采用土壤核酸提取试剂盒提取小鼠粪便样品总 DNA,具体操作步骤参照试剂盒说明书。提取完成后,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.5 16S 核糖体 RNA 的 V4 区扩增及高通量测序 以小鼠粪便样品总 DNA 为模板,扩增 16S 核糖体 RNA 的 V4 区(上游引物 520F:5'-AYTGGGYDTAAAGNG-3';下游引物 802R:5'-TACNVGGGTATCTAATCC-3'),不同样品用 7 个碱基组成的 barcode 进行区分^[11]。反应体系为模板

1 mL,520F 1 mL,802R 1 mL,Taq 酶 0.5 mL,Taq Buffer 5 mL,dNTP 5 mL,双蒸水 36.5 mL。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 反应结束后,将产物用胶回收纯化试剂盒纯化后,荧光定量,建库,通过 Illumina Miseq 平台进行测序。

1.2.6 生物信息学分析 测序完成后,对原始序列进行质量控制,对于通过质控的优质序列,采用 UCLUST 软件将相似度大于 97%的序列归为 1 个操作分类单元(operational taxonomic unit,OTU),并采用 RDP Classifier 软件对每个操作分类单元的代表序列进行种属分类鉴定^[12]。基于对测序深度的随机抽样,绘制 OTU 和 Shannon-Wiener 稀释曲线;基于细菌群落的丰度与均一度以及样品之间的 UniFrac 距离,进行 alpha 多样性和 beta 多样性的分析^[13];基于细菌群落的组成,在门和属两个分类水平上分别研究柠檬酸钠对小鼠肠道微生物的影响^[14]。

1.2.7 数据分析 试验所得数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,不同试验组间采用单因素方差分析中的 tukey 法进行显著性分析, $P < 0.05$ 被视为具显著性统计学意义。

2 结果与分析

2.1 柠檬酸钠对小鼠生理的影响

2.1.1 对小鼠体重和采食量的影响 为了探究柠檬酸钠对小鼠生长情况的影响,每周定时记录小鼠体重,见图 1(a)。小鼠按体重随机分组后,随着时间的增加,各组小鼠体重都呈上升趋势,但柠檬酸钠处理组的小鼠体重增长始终低于空白组。中剂量和高剂量组的体重增长趋势相同,而低剂量组小鼠的体重从第 3 周开始增长趋缓,最终体重低于中剂量和高剂量组。

小鼠采食量情况见图 1(b),空白组小鼠平均采食量为 4.56 g/d。随着试验时间的增加,小鼠的进食情况趋于稳定。柠檬酸钠处理组的采食量都低于空白组,并且从第 2 周开始,采食量呈现高剂量组 $>$ 中剂量组 $>$ 低剂量组的规律。高剂量组的小鼠表现出对添加柠檬酸钠饮食的逐渐耐受,摄取的柠檬酸钠显著增加($P < 0.05$)。采食量情况与小鼠体重变化情况相符,说明柠檬酸钠的添加会影响小鼠的营养吸收。但有研究^[9]表明,柠檬酸钠的添加会促进畜牧类动物的体重增加,这可能与每个动物的代谢情况不同有关。

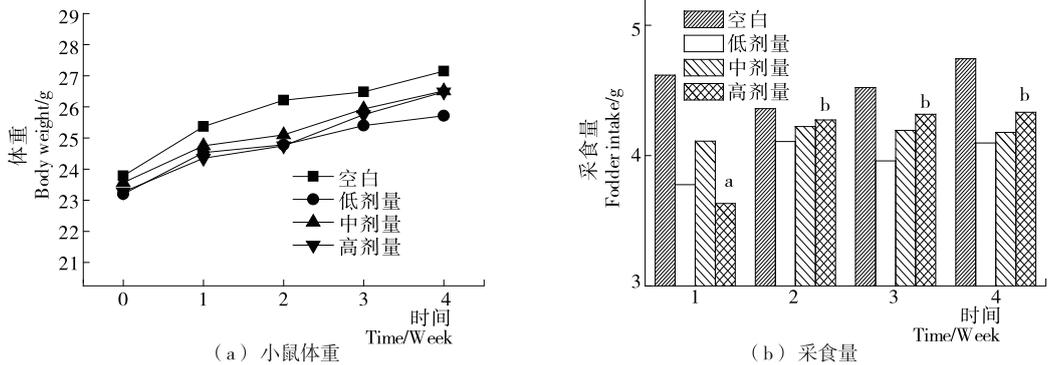
2.1.2 柠檬酸钠对小鼠血清生化指标的影响 试验结束后摘除眼球取血,检测试验终点时各别组小鼠血清中的总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、葡萄糖(Glu-G)等一系列生化指标,结果见表 1。由表 1 可知,柠檬酸钠的添加对小鼠血清中的 TC、TG 含量无显著影响($P > 0.05$)。摄食高剂量柠檬酸钠可显著增高小鼠血清中的 HDL-C,中剂量组的 HDL-C 也有所升高。HDL-C 可以促进动脉壁中胆固醇的流出,具有抗动脉粥样硬化的功能,可减少患冠状动脉心脏病的风险^[15]。并且有研究^[16]表明,血清中胆固醇含量与肠道菌代谢产生的短链脂肪酸有关。因此,推测柠檬酸钠可能是通过改变肠道菌

群从而影响小鼠血清中的 HDL-C 含量。而高剂量组的空腹葡萄糖含量较空白组有所降低,但差异不显著($P>0.05$)。

2.2 柠檬酸钠对小鼠肠道菌群的影响

2.2.1 测序结果的初步统计 本试验中,核酸扩增子的测序工作由 Illumina Miseq 第二代测序仪完成,下机数据经过质

量控制与过滤,共得到了 944 097 条高质量的细菌 16S 核糖体 RNA 的 V4 区序列,平均每个样品 26 974 条,序列的长度主要集中在 206~207 bp。将所有序列进行聚类,以 97% 序列相似度为阈值划分 OTU,共产生 31 075 个 OTU,各样品的初步统计信息汇总于表 2。



同一个组别的不同字母表示不同阶段的采食量之间具有显著差异($P<0.05, n=6$)。

图 1 膳食干预过程中不同组别小鼠体重和采食量的变化

Figure 1 Body weight and fodder intake of the mice of different groups during the intervention

表 1 柠檬酸钠对小鼠血清生化指标的影响[†]

Table 1 Serum biochemical parameters in mice of different groups after dietary intervention mmol/L

| 组别 | TC | TG | LDL-C | HDL-C | Glu-G |
|------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| 空白组 | 2.65±0.16 ^a | 2.01±0.25 ^a | 0.26±0.02 ^a | 2.17±0.15 ^b | 0.80±0.31 ^a |
| 低剂量组 | 2.71±0.29 ^a | 1.81±0.07 ^a | 0.29±0.04 ^a | 2.13±0.24 ^b | 0.86±0.15 ^a |
| 中剂量组 | 3.20±0.29 ^a | 2.73±0.29 ^a | 0.28±0.05 ^a | 2.32±0.22 ^{ab} | 0.86±0.49 ^a |
| 高剂量组 | 2.85±0.05 ^a | 2.34±0.21 ^a | 0.27±0.02 ^a | 2.53±0.07 ^a | 0.61±0.13 ^a |

[†] 同列的不同字母表示各组别间具有显著性差异($P<0.05, n=3$)。

表 2 测序结果统计汇总[†]

Table 2 Overview of sequencing results of each sample

| 样品编号 | 序列数量 | OTU 数量 | 样品编号 | 序列数量 | OTU 数量 |
|---------|--------|--------|---------|--------|--------|
| Con1.0 | 3 748 | 224 | CitM2.0 | 11 090 | 547 |
| Con2.0 | 9 016 | 493 | CitM3.0 | 32 141 | 961 |
| Con3.0 | 3 583 | 279 | CitM1.2 | 44 247 | 1 163 |
| Con1.2 | 23 751 | 711 | CitM2.2 | 43 249 | 1 431 |
| Con2.2 | 23 008 | 815 | CitM3.2 | 97 449 | 1 771 |
| Con3.2 | 18 825 | 920 | CitM1.4 | 61 202 | 2 034 |
| Con1.4 | 44 775 | 1 512 | CitM3.4 | 10 305 | 601 |
| Con2.4 | 18 943 | 1 027 | CitH1.0 | 25 528 | 495 |
| CitL2.0 | 13 665 | 624 | CitH2.0 | 27 696 | 356 |
| CitL1.2 | 44 066 | 1 655 | CitH3.0 | 24 880 | 495 |
| CitL2.2 | 55 502 | 1 903 | CitH1.2 | 59 793 | 1 903 |
| CitL3.2 | 39 195 | 1 010 | CitH2.2 | 59 674 | 1 714 |
| CitL1.4 | 27 511 | 1 216 | CitH3.2 | 56 443 | 1 864 |
| CitL2.4 | 12 781 | 760 | CitH2.4 | 11 794 | 581 |
| CitL3.4 | 7 681 | 610 | CitH3.4 | 4 792 | 385 |
| CitM1.0 | 26 980 | 810 | | | |

[†] Con1.0 表示空白组的 1 号个体在 0 周的粪便样品,CitL 代表低剂量组,CitM 代表中剂量组,CitH 代表高剂量组,其余编号以此类推。

对测序进行随机抽样,以抽到的序列数与其所能代表的 OTU 数量构建操作分类单元稀释曲线,当曲线趋于平坦时,说明测序深度合理,更多的测序量只能产生少量新的 OTU,反之则表明增加测序量还能产生较多新的 OTU。以抽到的序列数为横坐标,相应的微生物多样性指数(香农指数, Shannon index)为纵坐标,构建香农指数稀释曲线,该曲线可以反映样品在不同测序深度下的微生物多样性,曲线趋于平缓时,说明测序得到的信息量已经足够覆盖样品中大多数微生物。本试验所得到的操作分类单元和香农指数稀释曲线见图 2。

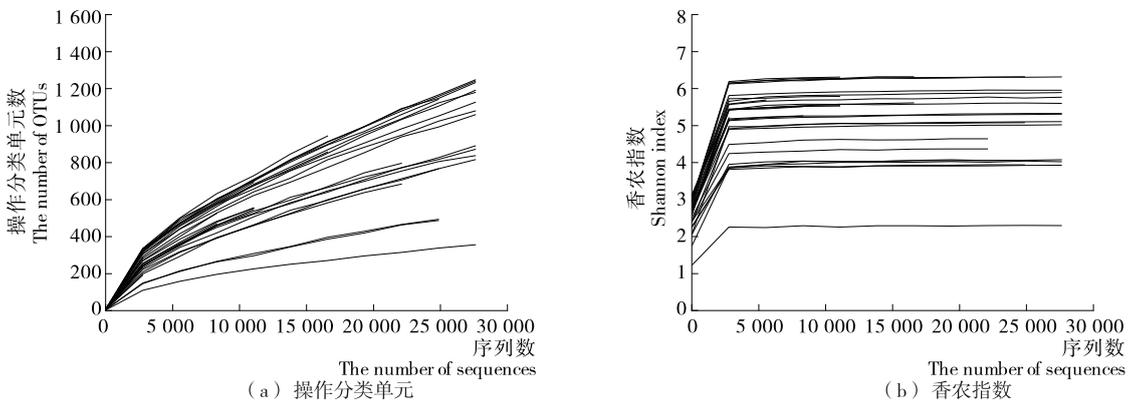
本试验中,大部分样品的 OTU 稀释曲线未能进入平坦期,但各样品曲线斜率逐渐减小见图 2(a),且香农指数稀释曲线已经饱和持平见图 2(b),说明尽管随着测序量增加新的种属可能会被发现,但是微生物的多样性已经不再变化^[17]。因此,当前测序量已经满足试验目的。

2.2.2 柠檬酸钠对小鼠肠道微生物多样性的影响

(1) Alpha 多样性:高通量测序后进行样品菌群的多样

性分析时,常用 Chao1 指数表示菌群丰度,用香农指数表示菌群多样性与均匀程度。Chao1 指数是用 Chao1 算法估计群落中含 OTU 数目的指数,该值也常在生态学中用来估计物种总数;香农指数是用来估算样品中微生物多样性的指数之一,是常用的反映 alpha 多样性的指数,香农指数越大,说明样品中的物种越丰富越均匀^[18]。本试验得到每个样品的 Chao1 指数和香农指数,然后按组别和采样时间计算均值,结果见表 3。

Chao1 指数显示,空白组和柠檬酸钠处理组第 4 周的 Chao1 指数都高于第 0 周,说明随着时间推移与鼠龄增长,肠道微环境中物种数量有所增多;第 2 周时,高剂量组的 Chao1 指数高于低、中剂量组,而第 4 周时,高剂量组的 Chao1 指数低于低剂量组,说明柠檬酸钠在饲料中的添加量对小鼠肠道微生物的物种丰度没有明显的影响,不同观测值的差别属于随机扰动。香农指数的变化趋势与 Chao1 值大致相同,说明饲料中柠檬酸钠的添加并不会影响小鼠肠道菌群的 alpha 多样性。



图中每条曲线代表一个样品

图 2 各样品的操作分类单元和香农指数稀释曲线

Figure 2 Rarefaction curve of OTU number and Shannon Index for each sample

表 3 各组样品的 Chao1 指数和香农指数

Table 3 Mean Chao1 and Shannon index of samples

| 组别 | 0 周 | | 2 周 | | 4 周 | |
|------|----------|------|----------|------|----------|------|
| | Chao1 指数 | 香农指数 | Chao1 指数 | 香农指数 | Chao1 指数 | 香农指数 |
| 空白组 | 613.51 | 5.26 | 565.57 | 4.72 | 729.60 | 6.14 |
| 低剂量组 | 513.81 | 5.72 | 622.03 | 4.84 | 783.26 | 5.97 |
| 中剂量组 | 602.89 | 5.08 | 600.82 | 4.24 | 700.11 | 5.42 |
| 高剂量组 | 573.31 | 5.35 | 681.30 | 5.46 | 701.12 | 5.43 |

(2) Beta 多样性:UniFrac 分析是通过物种的系统进化关系来比较不同菌群群落结构的一种方法,有效地克服了主成分分析等方法仅考虑群落间物种的数量和种类而忽视了物种间进化关系的缺点^[19]。PCoA 即主坐标分析(principal coordinate analysis)可以用来降维与可视化不同样品中微生物群落组成的相似与差异程度。使用 QIIME 软件对加权的 UniFrac 距离进行主坐标分析,得到排序结果,见图 3。

由图 3 可知,柠檬酸钠低剂量组都分布在 PC2 的负坐标轴一方,柠檬酸钠高剂量组都分布在 PC2 的正坐标轴一方和

PC3 轴的负方向;高剂量组的个体能够与其他组样品明显分离。这说明膳食中柠檬酸钠高剂量的添加会对小鼠肠道菌群的 beta 多样性造成影响。此外,图 3 中每个平行样品之间也存在一定的距离,应该增加平行样的个数,以便减小个体差异。

2.2.3 柠檬酸钠对小鼠肠道微生物组成在门水平的影响

将各组样品的微生物组成在门水平上进行统计分析,结果用同组样品的均值表示。由图 4 可知,在各个组别的小鼠肠道微生物中都主要检测出了厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌

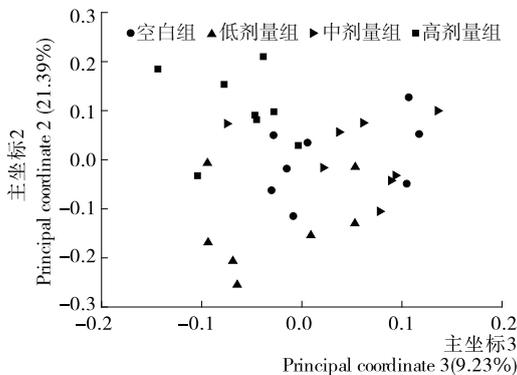


图 3 各组样品基于加权 UniFrac 距离的主坐标分析

Figure 3 Principal coordinate analysis of weighted UniFrac distances

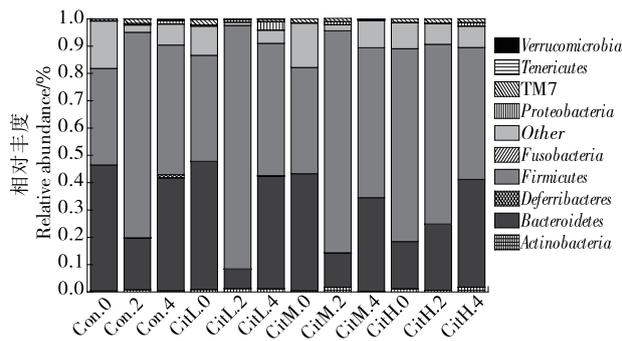


图 4 各组样品肠道微生物在门水平的组成和分布

Figure 4 The composition of intestinal microbiota of mice from different groups at phylum level

门 (*Bacteroidetes*)、变形菌门 (*Proteobacteria*)、放线菌门 (*Actinobacteria*)、梭杆菌门 (*Fusobacteria*)、TM7、疣微菌门 (*Verrucomicrobia*)、柔膜菌门 (*Tenericutes*) 和脱铁杆菌门 (*Deferribacteres*)。因此,说明柠檬酸钠对小鼠肠道菌群所属门的种类影响不大。在门水平上,小鼠肠道微生物的组成与人类肠道微生物是相似的^[20-21],厚壁菌门和拟杆菌门所占比例最大。

通过分析不同物种的相对丰度,可以看出空白组,柠檬酸钠低、中剂量组随着时间的推移都有类似的厚壁菌门先增加后减少,拟杆菌门先减少后增加的趋势;在膳食干预第 2 周和第 4 周时,空白组和柠檬酸钠处理组的肠道微生物门水平上的组成没有明显差异 ($P > 0.05$)。这可能是柠檬酸钠进入机体后,大部分被小肠吸收,而未能到达大肠对肠道菌群造成明显影响。

2.2.4 柠檬酸钠对小鼠肠道微生物组成在属水平的影响

在属水平上,对各组小鼠在不同时间点的肠道微生物包含的细菌种类进行统计分析,对于相对丰度小于 1% 的菌属,按其所属的门合并为其它,结果见图 5。从小鼠肠道微生物中检测到的主要有拟杆菌属 (*Bacteroides*)、厌氧支原体属 (*Anaeroplasm*)、*Odoribacter*、*Mucispirillum*、*Parabacteroides*、*Alistipes*、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、棒状杆菌属 (*Corynebacterium*)、*Butyricoccus*、多尔氏菌属 (*Dorea*)、*Enterorhabdus*、螺杆菌属 (*Helicobacter*) 等。由图 5 可知,随

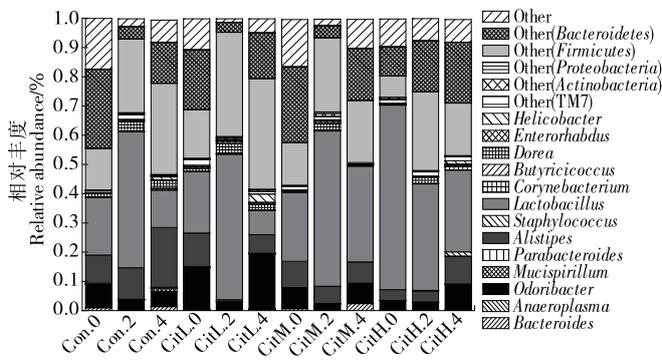


图 5 各组样品肠道微生物在属水平的组成和分布

Figure 5 The composition of intestinal microbiota of mice from different groups at genus level

着试验的进行,空白组和柠檬酸钠低、中剂量组都呈现类似的 *Lactobacillus* 先升高再降低的趋势,而高剂量组的 *Lactobacillus* 随着时间的推移逐渐减少;膳食干预第 2 周时,与空白组相比,低剂量和中剂量组的 *Lactobacillus* 增多, *Alistipes* 减少,而高剂量组的 *Lactobacillus*、*Alistipes* 都少于空白组;第 4 周时,与空白组相比,低剂量组的 *Lactobacillus*、*Alistipes* 增多, *Odoribacter* 减少,中、高剂量组的 *Lactobacillus* 增多, *Alistipes* 减少。

另外在柠檬酸钠高剂量组中检测到了相对丰度为 1.20% 的 *Corynebacterium* 和 1.50% 的 *Staphylococcus*,而在其他组别中这两种菌属没有检测到或含量较低。*Corynebacterium* (棒状杆菌属)除白喉棒状杆菌外,其他棒状杆菌为人类口腔、鼻腔、外阴和皮肤等处的寄生菌,一般无致病性,但可作为条件致病菌引起抵抗力低下的宿主发生各类感染^[22]。而 *Staphylococcus* (葡萄球菌属),多数为非致病菌,少数如金黄色葡萄球菌等可致病。说明在本试验设定的剂量下,摄入高剂量的柠檬酸钠会对肠道菌群有一定的影响,但该影响是否会关系到机体的健康,还有待对具体菌种的进一步检测。

3 结论

膳食中柠檬酸钠的添加能降低试验小鼠的体重,而高剂量的柠檬酸钠可显著提高小鼠血清中高密度脂蛋白胆固醇的含量。通过对小鼠粪便样品的菌群分析,发现柠檬酸钠的添加会影响其 β 多样性。在门水平上,与空白组相比,摄入柠檬酸钠不会影响肠道微生物所属门的种类,但会使厚壁菌门和拟杆菌门的比例发生变化,但是由于小鼠自身的个体差异很大,并且大部分的柠檬酸钠可能在小肠部位被吸收,因此,结果未呈现一定规律性。而在属水平上,除了共有的菌属外,在当前的测序深度下柠檬酸钠高剂量组还检测到了 *Corynebacterium* (棒状杆菌属) 和 *Staphylococcus* (葡萄球菌属),说明摄入高剂量的柠檬酸钠会对小鼠的肠道微生物造成一定影响,并可能通过菌群代谢产物短链脂肪酸的改变影响小鼠的血清生化指标。由于高通量测序成本昂贵,本试验所取平行样本较少,因此试验结果的说服力不够理想。应扩大样本数量,为进一步探究食品添加剂柠檬酸钠对肠道菌群的影响提供科学依据。

参考文献

- [1] Savage D C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract[J]. Annual Review of Microbiology, 1997, 31: 107-133.
- [2] Bäckhed F, Ruth E Ley, Justin L, et al. Host-Bacterial mutualism in the human intestine[J]. Science, 2005, 307(5 717): 1 915-1 920.
- [3] Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota - masters of host development and physiology[J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11(4): 227-238.
- [4] 赵兰涛, 任玮, 张英, 等. 黑米对小鼠肠道菌群的影响[J]. 食品与机械, 2012, 28(3): 24-27.
- [5] Carmody R N, Gerber G K, Luevano J M, et al. Diet dominates host genotype in shaping the murine gut microbiota[J]. Cell Host & Microbe, 2015, 17(1): 72-84.
- [6] David L A, Maurice C F, Carmody R N, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome [J]. Nature, 2014, 505(7 484): 559-563.
- [7] 杨金席. 柠檬酸钠的应用与生产工艺[J]. 辽宁化工, 2002, 31(6): 212.
- [8] 陈魏勇. 冰棒、冰淇淋添加剂复配研究与应用[D]. 湖南: 湖南农业大学, 2008: 24-33.
- [9] Ghanaatparast Rashti M, Shariatmadari F, Karimi Torshizi, et al. Effects of dietary propionic acid, sodium citrate, and phytase on growth performance, mineral digestibility, and tibia properties in broilers[J]. Journal of Applied Animal Research, 2016, 44(1): 370-375.
- [10] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1 069-1 072.
- [11] Zhao Le-le, Wang Gang, Siegel P, et al. Quantitative genetic background of the host influences gut microbiomes in chickens [J]. Scientific Reports, 2013, 3: 1 163.
- [12] Maughan H, Wang P W, Diaz Caballero J, et al. Analysis of the cystic fibrosis lung microbiota via serial illumina sequencing of bacterial 16S rRNA hypervariable regions[J]. PLoS ONE, 2012, 7(10): e45 791.
- [13] Lozupone C, Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities[J]. Applied and Environment Microbiology, 2005, 71: 8 228-8 235.
- [14] Huson D H, Mitra S, Weber N, et al. Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4 [J]. Genome Research, 2011, 21: 1 552-1 560.
- [15] Rader D J. High-density lipoproteins and atherosclerosis[J]. The American Journal of Cardiology, 2002, 90(8): 62-70.
- [16] Nishina P M, freedland R A. Effects of propionate on lipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes[J]. The Journal of Nutrition, 1990, 120(7): 668-673.
- [17] Hamady M, Knight R. Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges [J]. Genome Research, 2009, 19(7): 1 141-1 152.
- [18] Kemp P F, Aller J Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 47(2): 161-177.
- [19] Hamady M, Lozupone C, Knight R. Fast UniFrac: facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and PhyloChip data[J]. ISME J., 2010, 4(1): 17-27.
- [20] Eckburg P B, Bik E M, Bernstein C N, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora [J]. Science, 2005, 308(5 728): 1 635-1 638.
- [21] Ley Ruth E, Bäckhed Fredrik, Turnbaugh Peter, et al. Obesity alters gut microbial ecology[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005, 102(31): 11 070-11 075.
- [22] Murray P R. Manual of clinical microbiology[M]. Washington D C: American Society for Microbiology Publication, 1995: 235.

信息窗

研究发现牛吃抗生素甲烷排得多

中国科学报讯 农场主为牛使用抗生素产生的影响可能不仅仅是出现耐药细菌,这也可能推动温室气体的排放。

四环素是一种常用的抗生素。研究人员分析了使用四环素治疗 3 d 后,牛排泄物中的甲烷数量。发现使用抗生素的牛的排泄物中,能产生温室效应的甲烷的排放量比未使用抗生素的牛平均高 80%。相关结果近日在线发表于英国《皇家学会学报 B》。

而之所以出现这种情况,是因为使用抗生素后,牛消化系统内的抗生素敏感细菌被抑制,而一种能产生甲烷的微生物(古生菌)的数量相对增加。该研究小组表示,这是首次发现牛使用抗生素能增加温室气体的排放量。

最近有研究显示,全世界每年由反刍牲畜产生的甲烷

对地球气候变暖所起的作用相当于 21 亿 t 二氧化碳的效果,是与人类活动相关的温室气体排放量的 4%还多一点。这让奶牛成为甲烷减排的诱人目标。由于牛粪中的甲烷排放低于其暖气中的甲烷,因此,研究人员将分析使用抗生素对牛体内的甲烷的影响。

不过,研究曾发现一种名为 3-nitrooxypropanol 的化合物(也称为 3NOP)能大量减少牛的甲烷排放。将 3NOP 添加到 84 只产奶的荷斯坦牛的饲料中,并连续 12 周监测它们的甲烷产量。结果显示,甲烷排放量平均下降了 30%。而且,该添加剂似乎并没有影响奶牛的胃口,也没有影响奶牛产奶或者是所产牛奶的构成。

(来源:www.foodmate.net)