

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.08.003

低聚半乳糖对早产大鼠肠道菌群的调节作用*

陈远东, 卢红艳[△], 常明, 单继艳

(江苏大学附属医院儿科, 江苏镇江 212001)

[摘要] **目的** 探讨低聚半乳糖(GOS)对早产大鼠肠道菌群的调节作用。**方法** 早产新生大鼠分为 GOS 组和对照组, GOS 组每天滴管喂养 GOS 4 g/kg, 共 14 d。于喂养 GOS 后 7 d 和 14 d, 观察大鼠一般情况并称质量, 同时取大鼠直肠末端粪便, 行双歧杆菌、乳酸杆菌、肠杆菌及肠球菌培养并行菌落计数。**结果** GOS 组与对照组在给药期间均正常生长, 精神状态等未见异常。与对照组比较, GOS 组体质量增长差异无统计学意义($P>0.05$), 使用 GOS 7 d 时, 双歧杆菌、乳酸杆菌、肠杆菌及肠球菌与同时点对照组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。使用 GOS 14 d 后, 大鼠粪便中双歧杆菌、乳酸杆菌较对照组明显增加, 而肠杆菌、肠球菌明显减少, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 低聚半乳糖可促进早产鼠双歧杆菌和乳酸杆菌增长, 抑制肠杆菌及肠球菌生长, 从而调节肠道菌群平衡。

[关键词] 低聚半乳糖; 早产大鼠; 肠道菌群**[中图分类号]** R153.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)08-1015-02**Effects of galactooligosaccharide on the intestinal flora in premature rats***Chen Yuandong, Lu Hongyan[△], Chang Ming, Shan Jiyan

(Department of Pediatrics, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effects of galactooligosaccharide on the intestinal flora in premature rats. **Methods** Premature Sprague-Dawley rats were randomly divided into GOS group and control group. Premature rats in GOS group were feeding with GOS according 4 g/kg by dropper for 14 d. At 7 d and 14 d after feeding, the mental state and weight of rats were observed and recorded, the fresh feces in terminal rectum were collected to culture and count the number of colonies of bifidobacteria, lactobacillus, enterobacteria and enterococcus. **Results** Rats in GOS and the control group were normal growth during the administration period, mental state was not abnormal. Compared with the same time point of the control group, there was no significant difference in weight gain between the GOS group($P>0.05$). After feeding GOS for 7 d, there was no statistically significant difference between the number of colonies of bifidobacteria, lactobacillus, enterobacteria and enterococcus ($P>0.05$). After feeding GOS for 14 d, the number of colonies of bifidobacteria and lactobacillus increased significantly($P<0.05$), while the number of enterobacteria and enterococcus decreased significantly ($P<0.05$). **Conclusion** Galactooligosaccharide could promote the proliferation of bifidobacterium and lactobacillus, inhibit the growth and reproduction of enterobacteria and enterococcus, so regulate the balance of intestinal flora.

[Key words] galacto oligosaccharide; preterm rats; intestinal flora

肠道菌群与人类健康密切相关。早产儿生后受多种因素影响使肠道菌群定植延迟, 多样性丰度减少, 达优势化时间延迟, 短期有增加感染和炎症进程风险, 长期甚至导致代谢综合征、特应质及神经-认知发育异常^[1-3]。因此, 肠道菌群的稳定是保障早产儿健康的第 1 道防线。为尽早建立完善的肠道菌群环境, 可能需要进行一定的营养手段干预和调控。低聚半乳糖(galactooligosaccharide, GOS)是一种具有天然属性的功能性低聚糖, 动物乳汁中存在微量 GOS, 但人乳汁中 GOS 含量较多^[4]。有研究表明, 短链 GOS 和长链低聚果糖的益生元混合体能够促进人工喂养早产儿肠道内双歧杆菌和乳酸杆菌增殖, 同时抑制铜绿假单胞菌、肠杆菌、克雷伯杆菌、变形杆菌、B 族链球菌及梭状芽胞杆菌等致病菌生长^[5]。新生儿时期是肠道菌群定植和建立健康肠道微生态的关键时期。本研究通过观察 GOS 早期干预对早产新生大鼠肠道菌群的影响, 探讨 GOS 在早产儿中的益生元效果。

1 材料与方**1.1 材料** 选取清洁级 SD 雌鼠体质量 200~220 g, 雄鼠体

质量 220~250 g, 由江苏大学实验动物中心提供; GOS 购自保龄宝生物股份有限公司, 双歧杆菌培养基(BBL)、乳酸杆菌培养基(MRS)、肠杆菌培养基(EMB)及肠球菌培养基均购自青岛日水生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组 SD 大鼠按雌雄比 3:1 合笼交配, 次日晨取雌鼠阴道分泌物涂片, 镜检见精子记为妊娠第 1 天。将受孕 21 d(预产期 22 d)的母鼠行剖宫产, 娩出的新生 SD 大鼠作为早产鼠。SD 大鼠适应性喂养 12~24 h, 分为 GOS 组和对照组, 每组各 8 只, 雌雄不限。GOS 组早产鼠每天滴管喂养 GOS(4 g/kg), 共 14 d, 余处理同对照组。早产鼠和母鼠同舍饲养, 采用随母哺乳方式, 根据需要自由哺乳。对照组与 GOS 组早产大鼠在生后均正常生长, 精神状态等未见异常。

1.2.2 粪样采集与菌落培养 于喂养 GOS 后 7 d 和 14 d, 晨饲前刮取早产鼠直肠末端粪便, 装入灭菌后的离心管, 迅速送回实验室。准确称取 0.05 g 粪样, 用生理盐水等比稀释到 10:1~10:6 不同滴度(根据培养后的菌落密度调整)。双歧

杆菌及乳酸杆菌接种稀释度约 $10:5 \sim 10:6$, 肠杆菌及肠球菌稀释度约 $10:3$ 。每个滴度取 $200 \mu\text{L}$, 在准备好的平板培养基上涂菌。每个稀释浓度涂 3 个培养皿。BBL 和 MRS 平皿于 37°C 厌氧培养 48 h, EMB 和肠球菌平皿移至常规培养箱, 有氧环境 37°C 培养 48 h。

1.2.3 大便菌群鉴定及菌落计数 培养结束后, 挑取典型菌落直接涂片染色镜检并应用生化鉴定管进行细菌鉴定。以菌落形态、革兰染色镜检、生化反应等鉴定计数菌落, 计算出每克湿便中的菌数, 取对数后进行统计处理, 以 $1 \text{ g}(\text{CFU}/\text{g})$ 表示, 即每 g 粪便标本的菌落形成单位(CFU)的对数值(1 g)。双歧杆菌为镜检革兰阳性菌(G^+)、无芽孢、形态不规则、过氧化氢酶阴性的所有菌落; 乳酸杆菌为镜检 G^+ 、形态规则、无芽孢的所有菌落; 肠杆菌为镜检革兰阴性菌(G^-)所有菌落; 肠球菌为明显黑色晕圈, 镜检 G^+ 球菌所有菌落。

1.3 统计学处理 采用 SPSS12.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间两样本比较采用独立样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 2 GOS 对早产新生大鼠肠道菌群的影响($\bar{x} \pm s, \log \text{CFU}/\text{g}$)

组别	n	7 d				14 d			
		双歧杆菌	乳酸杆菌	肠杆菌	肠球菌	双歧杆菌	乳酸杆菌	肠杆菌	肠球菌
对照组	8	6.27±0.33	5.14±0.35	7.03±0.55	4.84±0.23	7.33±0.48	6.42±0.59	7.71±0.68	5.64±0.32
GOS 组	8	6.53±0.56	5.48±0.41	6.89±0.57	4.74±0.24	8.42±0.55	7.59±0.49	6.95±0.52	5.11±0.25
t		1.13	1.79	0.54	0.85	4.22	4.31	2.5	3.69
P		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

3 讨 论

人体消化道正常菌群包括双歧杆菌、乳酸杆菌、肠球菌、肠杆菌和拟杆菌属等^[6]。双歧杆菌、乳酸杆菌是人肠道中有益菌的代表, 肠道益生菌可使碳水化合物分解产生多种有机酸, 降低肠道 pH 值, 竞争性抑制肠道内有害菌增殖, 减少腐败物产生等发挥对肠道的保护作用^[7]。GOS 是益生元的一种, 其分子结构一般是在半乳糖或葡萄糖分子上连接 1~7 个半乳糖基。在肠道中, GOS 可作为选择性的微生物前体, 被某些细菌的 β -半乳糖苷酶水解为葡萄糖和半乳糖, 作为细菌复制与增殖的碳源, 从而影响肠道菌群平衡。有研究报道, 初生犊牛饲喂 GOS 可影响肠道菌群平衡, 使双歧杆菌成为肠道优势菌^[8]。采用传统体外培养与体内试验方法, 以调节婴儿肠道有益菌群为目的, 李艳莉等^[9]评价 GOS 的益生功能, 发现 GOS 对肠道有益菌有较好的增殖作用, 能有效调节肠道菌群失衡, 这些功能可能与肠杆菌、肠球菌等病原菌不能利用 GOS, 而双歧杆菌等有益菌可利用 GOS 作为自身增殖的碳源, 竞争性阻止病原菌的定植有关。尽管有关 GOS 对肠道菌群的调节作用已有较多研究, 但在早产儿中的作用尚不十分明确。

早产儿由于胃肠功能不成熟, 出生体质量低, 抗生素应用, 管饲喂养, 重症监护环境及缺乏母乳喂养等原因, 使早产儿肠道菌群定植延迟, 多样性丰度显著减少, 特别是早产儿抗生素使用, 建立了以需氧菌为基础的不健康肠道菌群, 这些不仅影响了早产儿对营养素的摄取, 而且影响了肠道及全身免疫系统的成熟, 可能出现过敏, 甚至出现坏死性小肠结肠炎^[10]。因此, 维持肠道菌群平衡, 对早产儿的生长发育具有重要作用。本研究发现, 与对照组相比, GOS 组使用 GOS 后 7 d, 对肠道菌群影响不明显, 这可能与早产儿肠道菌群建立较晚及 GOS

2 结 果

2.1 GOS 对早产大鼠体质量的影响 对照组与 GOS 组大鼠体质量增长在喂服 GOS 前及喂服 GOS 后 7、14 d, 差异均无统计学意义($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 GOS 对早产大鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, \text{g}$)

组别	n	1 d	7 d	14 d
对照组	8	4.51±0.43	15.31±1.02	42.84±1.62
GOS 组	8	4.53±0.65	15.92±1.16	43.92±1.51
t		0.05	1.12	1.38
P		>0.05	>0.05	>0.05

2.2 GOS 对早产大鼠肠道菌群的影响 与对照组相比, GOS 组使用 GOS 后 7 d, 双歧杆菌、乳酸杆菌、肠杆菌及肠球菌生长差异无统计学意义($P > 0.05$)。使用 GOS 后 14 d, 大鼠粪便中双歧杆菌、乳酸杆菌较对照组明显增加, 而肠杆菌、肠球菌明显减少, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 见表 2。

行程不足有关。使用 GOS 后 14 d, 大鼠粪便中双歧杆菌、乳酸杆菌较对照组明显增加, 而肠杆菌、肠球菌明显减少, 提示 GOS 可有效发挥对早产鼠双歧杆菌和乳酸菌的增殖作用, 调节肠道菌群平衡, 使肠道益生菌成为肠道优势菌。本研究中, 尽管发现 GOS 组体质量较对照组稍有增加, 但差异无统计学意义($P > 0.05$), 说明 GOS 对早产大鼠体质量增加可能无明显影响。但有研究发现, GOS 不仅可调节肠道菌群, 还可改善应激大鼠肠道黏膜屏障功能, 对小鼠有免疫增强作用, 但对早产大鼠肠道屏障及免疫功能影响尚不明确^[11-12]。

肠道微生物区系的早期发育很大程度上依赖于摄取的食物。婴儿体内双歧杆菌菌群的建立, 也依赖于母乳中的 GOS。动物乳汁中存在微量 GOS, 而很多早产儿由于种种原因, 不能母乳喂养只能配方奶喂养, 因此, 给早产儿配方奶中添加 GOS 可较好地模拟母乳对肠道的有益作用, 但这仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Morowitz MJ, Denef VJ, Costello EK, et al. Strain-resolved community genomic analysis of gut microbial colonization in a premature infant[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(3): 1128-1133.
- [2] Arbolea S, Solís G, Fernández N, et al. Facultative to strict anaerobes ratio in the preterm infant microbiota: a target for intervention? [J]. Gut Microbes, 2012, 3(6): 583-588.
- [3] Ungvári S, Szendrői A, Székely P, et al. Gut microbiota of the very-low-birth-weight infant[J]. Pediatr Res, 2015, 77(1/2): 205-216.

升作用。有学者研究糖尿病大鼠周围神经病变的超微结构变化,发现糖尿病大鼠腰骶部神经髓鞘水肿变性甚至脱落,神经细胞胞质及胶质空泡变性,同时腹腔内注射胰岛素和鼠 NGF 治疗后,大鼠膀胱逼尿肌细胞和腰骶部神经元中 NGF 的表达均明显增强,神经变性明显改善,优于单纯胰岛素或鼠神经生长因子治疗组^[8]。以上研究均说明,无论中药或西药,只要能够有效控制血糖,均能增强神经组织 NGF 的表达,促进神经病变的再生修复。

低血糖是糖尿病临床治疗过程当中常见的不良反应,许多糖尿病患者由于缺乏对合理规范服用降糖药物的良好认识,常有低血糖的发生,甚至频繁的低血糖反应发作亦不鲜见。低血糖给患者带来的危害远较高血糖更快更严重,轻者即可致神经功能损害,对包括 DPN 在内的神经系统损伤恢复是极其不利的。反复重度低血糖对糖尿病大鼠海马 PKA 磷酸化水平发生明显增高改变,提示可致脑损伤和认知功能障碍,甚至神经元的丧失^[9]。有研究用胰岛素诱导大鼠低血糖后在海马区免疫组织化学法检测 Nogo-A,发现低血糖组大鼠海马区 Nogo-A 表达明显降低,而低血糖后葡萄糖再灌注大鼠 Nogo-A 表达进一步降低,且细胞凋亡最多,提示低血糖不仅导致中枢神经损伤,而且低血糖后葡萄糖再灌注可加剧这种损伤,对于临床常用的补糖纠正低血糖的方法提出了一定警示作用^[10]。格列本脲片及盐酸二甲双胍片均有较强的降低血糖作用,虽然格列本脲片不良反应比较大,但是由于价格便宜,在我国广大区域仍是临床常用的口服降糖药物,有报道服用格列本脲片可致较高的低血糖发生率,其中低血糖昏迷高达 62.7%,服用格列本脲片的人群以老年人居多,往往合并心脑血管等各种慢性病,肾功能减退,长期混合服用多种药物,更易导致严重的低血糖反应,持久且难以纠正^[11]。本实验采用格列本脲片+盐酸二甲双胍片超剂量灌胃 2 型糖尿病大鼠致反复低血糖发作,观察到低血糖组大鼠较未降糖治疗糖尿病大鼠脑组织 NGF mRNA 的表达更低,并随着时间呈逐渐加重趋势,虽然未降糖治疗糖尿病大鼠的表达也呈逐渐降低表现,但低血糖组是更加明显,说明低血糖严重妨碍了 NGF 的合成及表达,尤其频繁反复发作的低血糖影响作用更甚,非常不利于糖尿病性神经病变的再生修复,为临床上口服降糖药治疗糖尿病过程中的低血糖危

害性的认识提供了进一步的理论依据。

参考文献

- [1] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2013 版) [J]. 中国糖尿病杂志, 2014, 22(8): 2-38.
- [2] 张玉领, 陈培, 刘家秀, 等. 2 型糖尿病大鼠模型的建立 [J]. 现代预防医学, 2012, 39(15): 3922-3924.
- [3] 于洋, 洪仕君, 赵丽萍, 等. 神经生长因子 NGF 的神经元保护作用机制及临床应用研究现状 [J]. 昆明医科大学学报, 2014, 35(2): 148-151.
- [4] Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction [J]. Annu Rev Biochem, 2003 (72): 609-642.
- [5] 桂丽, 黄大可, 王盛花, 等. 胰岛素对糖尿病大鼠下颌下腺内 NGF 及 VEGF 表达的影响 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2014, 23(3): 237-240.
- [6] 王蕾, 吕楠, 郝迪, 等. 降糖通络汤对 DPN 大鼠 NGF mRNA 表达的影响及对雪旺细胞抗氧化、抗凋亡作用机制研究 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(10): 3671-3676.
- [7] 吕翠岩, 李秋明, 毛颖秋, 等. 糖痹康对糖尿病大鼠坐骨神经 NGF 蛋白及 NGF mRNA 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(5): 157-161.
- [8] 郭学敬, 郭跃先, 白艳, 等. 糖尿病大鼠治疗后膀胱和腰骶背根神经节中神经生长因子的表达及超微结构研究 [J]. 现代泌尿外科杂志, 2012, 17(1): 42-45.
- [9] 项迎春, 廖美华, 田允, 等. 反复重度低血糖对糖尿病大鼠海马 PKA/PKC/CaMK II 磷酸化信号通路的影响 [J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(6): 586-590.
- [10] 王喜云, 赵玉武. 低血糖后葡萄糖再灌注大鼠海马 Nogo-A 蛋白的表达 [J]. 脑与神经疾病杂志, 2013, 21(6): 441-445.
- [11] 郭美华, 邱晓红, 马满玲, 等. 格列本脲致低血糖反应的文献分析 [J]. 中国药物警戒, 2013, 10(7): 424-431.

(收稿日期: 2016-07-20 修回日期: 2016-09-18)

(上接第 1016 页)

- [4] Musilova S, Rada V, Marounek M, et al. Prebiotic effects of a novel combination of galactooligosaccharides and maltodextrins [J]. J Med Food, 2015, 18(6): 685-689.
- [5] Knol J, Boehm G, Lidestri M, et al. Increase of faecal bifidobacteria due to dietary oligosaccharides induces a reduction of clinically relevant pathogen germs in the faeces of formula-fed preterm infants [J]. Acta Paediatr Suppl, 2005, 94(449): 31-33.
- [6] Romano-Keeler J, Moore DJ, Wang C, et al. Early Life establishment of site-specific microbial communities in the gut [J]. Gut Microbes, 2014, 5(2): 192-201.
- [7] Malmuthuge N, Griebel PJ, Guan LL. The gut microbiome and Its potential role in the development and function of newborn calf gastrointestinal tract [J]. Nature, 2015, 2(4814): 459-460.

- [8] 王智航, 姜成哲, 崔明勋, 等. 低聚半乳糖对延边黄牛粪牛粪样菌群、血液指标及生长性能的影响 [J]. 动物营养学报, 2011, 23(7): 1247-1252.
- [9] 李艳莉, 李倩, 霍贵成. 低聚果糖和低聚半乳糖的肠道益生功能研究 [J]. 食品工业, 2012, 33(8): 73-76.
- [10] Dardas M, Gill SR, Grier A, et al. The impact of postnatal antibiotics on the preterm intestinal microbiome [J]. Pediatr Res, 2014, 76(2): 150-158.
- [11] 谢婷, 夏金荣, 高峻, 等. 低聚半乳糖对大鼠肠黏膜屏障功能的影响 [J]. 第二军医大学学报, 2014, 35(1): 55-60.
- [12] 郑珊, 杜宏举, 马玲, 等. 低聚半乳糖对小鼠免疫功能的影响 [J]. 首都公共卫生, 2013, 7(4): 163-165.

(收稿日期: 2016-07-19 修回日期: 2016-09-17)