

DOI:10.13350/j.cjpb.250811

• 论著 •

基于人粪便标本的肠道有益菌分离及其治疗 DSS 诱导结肠炎的潜力*

李志琴^{1,2}, 时尚^{1,2}, 张晓琳¹, 柳思思¹, 马春蕾¹, 崔英姿¹, 王文珂¹, 张莹^{1**}, 李波清^{1**}

(1. 滨州医学院基础医学院, 山东烟台 264003; 2. 山东农业大学生命科学学院)

【摘要】 目的 从健康成人分离肠道有益菌, 并初步研究其对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的小鼠结肠炎的治疗作用。

方法 利用 Karmali、YCFA 和 Anaerobe Basal Broth 基础培养基, 通过补充多糖及 L-半胱氨酸制备 12 种选择性培养基分离培养健康成人粪便标本中的厌氧菌。基于 16S rRNA 测序和 MEGA11 软件进行系统发育分析(邻接法, bootstrap = 1000)筛选出假小链状双歧杆菌、普通拟杆菌和长双歧杆菌作为目标有益菌。建立 DSS 诱导的小鼠结肠炎模型, 将造模小鼠随机分为 3 组: 长双歧杆菌治疗组(BL 组)、普通拟杆菌治疗组(BV 组)及假小链状双歧杆菌治疗组(BP 组)。连续监测体重、粪便性状及隐血指标, H&E 染色评估结肠病理损伤。

结果 12 种培养基分离的菌株分类群存在差异: Karmali 系列培养基分离出 7 属 11 种厌氧菌, YCFA 系列培养基分离出 4 属 5 种厌氧菌, Anaerobe Basal Broth 系列培养基分离出 7 属 8 种厌氧菌。DSS 诱导结肠炎模型中, 治疗组体重下降显著缓解, BL、BV、BP 组经治疗后体重分别为初始的 87.15%、90.56%、94.21%, 均高于 DSS 组(84.75%)。DAI 评分显示, 治疗组(BL 3.74±0.17, BV 3.73±0.03, BP 3.28±0.09)较 DSS 组(4.37±0.23)显著降低($P<0.05$)。结肠长度分析表明, 治疗组(BL 5.5±0.3 cm, BV 5.97±0.91 cm, BP 6.23±0.33 cm)显著优于 DSS 组(4.68±0.68 cm)($F=5.878, P<0.05$)。H&E 染色结果显示, DSS 组出现广泛溃疡、炎性浸润及隐窝破坏, 杯状细胞减少; 而治疗组溃疡面积缩小, 炎性细胞与纤维组织部分消退, 隐窝修复及杯状细胞数量回升。其中 BP 组小鼠结肠组织隐窝重建及杯状细胞增殖最显著。

结论 添加不同多糖的 3 类培养基有利于分离获得人类肠道中更多种类的厌氧菌。筛选出的 3 种肠道有益菌均可治疗小鼠结肠炎, 其中假小链状双歧杆菌对小鼠结肠炎的治疗效果最佳。

【关键词】 肠道有益菌; 分离培养; 炎症性肠病; 假小链状双歧杆菌**【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-5234(2025)08-1028-07

[Journal of Pathogen Biology. 2025 Aug.; 20(08):1028-1034.]

Isolation of beneficial intestinal bacteria based on human fecal specimens and its therapeutic potential for DSS-induced colitis

LI Zhiqin¹, SHI Shang^{1,2}, ZHANG Xiaolin¹, LIU Sisi¹, MA Chunlei¹, CUI Yingzi¹, WANG Wenke¹, ZHANG Ying¹, LI Boqing¹ (1. Binzhou Medical College, College of Basic Medical Sciences, Yantai 264003, Shandong, China; 2. Shandong Agricultural University, College of Life Sciences)***

【Abstract】 Objective To isolate beneficial intestinal bacteria from healthy adults and to preliminarily evaluate their therapeutic effects on dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. **Methods** Twelve selective media were prepared by supplementing Karmali, YCFA, and Anaerobe Basal Broth basal media with various polysaccharides and L-cysteine to isolate anaerobic bacteria from fecal samples of healthy adults. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA sequencing was performed using MEGA11 software (neighbor-joining method, bootstrap = 1000) to identify *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bacteroides vulgatus*, and *Bifidobacterium longum* as target beneficial strains. A dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis model was established in mice, which were then randomly assigned to one of three treatment groups: the *B. longum* group (BL), the *B. vulgatus* group (BV), and the *B. pseudocatenulatum* group (BP). Body weight, stool characteristics, and fecal occult blood were continuously monitored. H&E staining was used to evaluate histopathological damage in the colon. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 10, with significance defined as $P<0.05$. **Results** There were differences in the taxonomic profiles of strains isolated from the 12 media; Karmali series media yielded 7 genera and 11 species of anaerobes, YCFA series 4 genera and 5 species, and

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 82172560); 泰山学者工程专项经费资助项目(No. tsqn202211229); 烟台市级以上领军人才专项配套经费资助项目。** **【通信作者】** 张莹, E-mail: zhangying99g99@163.com; 李波清, E-mail: sdliboqing@163.com**【作者简介】** 李志琴(1998-), 女, 山东潍坊人, 硕士研究生在读, 主要从事胃肠道微生物与健康研究, E-mail: lizhiqin1632023@163.com

Anaerobe Basal Broth series 7 genera and 8 species. In the DSS-induced colitis model, the treatment groups showed significant attenuation of body weight loss. After treatment, the body weights of the BL, BV, and BP groups were 87.15%, 90.56%, and 94.21% of their initial values, respectively, all higher than that of the DSS group (84.75%). DAI scores in the treatment groups (BL: 3.74 ± 0.17 ; BV: 3.73 ± 0.03 ; BP: 3.28 ± 0.09) were significantly lower than in the DSS group (4.37 ± 0.23 ; $P < 0.05$). Colon length analysis showed that the treatment group (BL 5.5 ± 0.3 cm, BV 5.97 ± 0.91 cm, BP 6.23 ± 0.33 cm) was significantly longer colons than the DSS group (4.68 ± 0.68 cm) ($F = 5.878$, $P < 0.05$). H&E staining revealed that the DSS group exhibited extensive ulceration, inflammatory infiltration, crypt destruction, and a reduction in goblet cells. In contrast, the treatment groups showed reduced ulceration, partial resolution of inflammation and fibrosis, crypt repair, and restoration of goblet cell numbers. The reconstruction of crypts and the proliferation of goblet cells in the colonic tissue were most pronounced in the BP group of mice. **Conclusion** The three types of media supplemented with different polysaccharides facilitated the isolation of a broader range of anaerobic bacterial species from the human gut. All three screened probiotic strains demonstrated therapeutic effects against murine colitis, with *B. pseudocatenulatum* showing the most pronounced efficacy.

【Keywords】 intestinal beneficial bacteria; isolation and culture; inflammatory bowel disease; *Bifidobacterium pseudocatenulatum*

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种慢性肠道炎症性疾病,患者常出现持续腹泻、腹痛、发热及呕吐等症状,生活质量受到严重影响^[1]。该病发病机制复杂,涉及到遗传易感性、环境因素及肠道微生物群失调等因素^[2],其中肠道微生物群失衡近年来备受研究关注^[3]。IBD患者肠道微生物群落结构与健康人群差异显著,表现为有益菌减少、有害菌增多,这种菌群失衡可能直接参与IBD的发生与发展。

肠道有益菌在维持肠道健康中发挥重要作用,如抗氧化、增强肠道屏障完整性、调节免疫反应、改善菌群组成等,在缓解IBD患者炎症反应中展现出巨大潜力^[4]。因此,高效分离培养肠道有益菌对于深入理解其在IBD中的作用机制以及开发针对性治疗策略具有重要意义。现有研究表明肠道有益菌多为厌氧菌,然而,肠道厌氧菌的分离培养面临诸多挑战。因其生长环境特殊、培养条件苛刻^[5],不同种类厌氧菌在相对丰度、营养需求、生长速度等方面差异明显,导致大规模分离培养难度增加^[6]。但是,肠道微生物群能通过分泌酶系降解膳食纤维和植物细胞壁多糖等物质^[7],产生短链脂肪酸、维生素等有益物质,并为自身生长提供能量。植物细胞壁多糖作为主要碳源,可被多种微生物分解利用^[8],但由于多糖结构及细菌酶系的差异,不同细菌属对多糖的利用能力也有所不同^[9]。因此,通过获得更多样化的肠道有益菌来系统性评估其在IBD的治疗潜力为IBD的治疗提供了一种新思路。

基于上述背景,本研究拟通过向基础培养基中补充多种多糖来分离培养种类丰富的肠道有益菌,并初步研究其对DSS诱导小鼠IBD的治疗效果,旨在为肠道有益菌在IBD治疗中的应用提供实验依据。

材料与方法

1 材料

1.1 粪便标本 粪便标本采集自健康青年志愿者(女性,25岁),志愿者在采样前6个月内未使用抗生素或其他可能影响肠道菌群的药物。标本采集和实验获得滨州医学院伦理委员会批准(伦理号:2024-L059),志愿者签署了知情同意书。取新鲜粪便标本10g与50mL磷酸盐缓冲液混匀,经纱布过滤后得到粪菌液标本。

1.2 实验动物 雌性C57BL/6小鼠,7周龄,体重19~20g,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,适应性喂养1周,自由饮水和摄食。

1.3 培养基及主要试剂 Karmali培养基、Anaerobe Basal Broth培养基购自英国OXOID公司;YCFA培养基购自中国青岛海博生物公司;葡聚糖购自上海生工生物工程有限公司;阿拉伯半乳糖、半乳甘露聚糖购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;L-半胱氨酸购自上海碧云天生物技术有限公司;琼脂粉购自中国北京索莱宝科技有限公司;细菌基因组DNA提取试剂盒购自中国北京天根生化科技有限公司;GL DNA Marker 2000购自湖南艾克瑞生物工程有限公司;GeneJET凝胶回收试剂盒购自美国Thermo Fisher公司;磷酸盐缓冲液购自美国Hyclone公司;FastPfu DNA Polymerase购自北京全式金生物技术股份有限公司。葡聚糖硫酸钠(DSS)购自上海百生跃生物科技有限公司;4%PFA固定液购自北京兰杰柯科技有限公司;粪便隐血试剂盒购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司。

1.4 主要仪器 厌氧微需氧培养系统购自美国爱思美;隔水式37℃培养箱购自中国上海一恒科学仪器有限公司;超净工作台购自中国苏净安泰空气技术有限公司;低温超速离心机购自德国Eppendorf公司;稳压电泳

仪购自美国 BIO-RAD 公司;梯度 PCR 扩增仪购自美国 Thermo Fisher 公司;凝胶成像分析系统购自中国北京君意东方电泳设备有限公司。

1.5 引物序列 本研究所用引物为细菌 16S rRNA 基因的通用引物 27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCT CAG-3'; 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。

2 方法

2.1 培养基的制备 本研究从凝固剂、碳源、抗氧化剂角度对培养基进行调整和组合,设置了 3 组共 12 种培养基。Karmali 培养基、YCFA 培养基、Anaerobe Basal Broth 培养基,分别加入 1% 的葡聚糖、阿拉伯半乳聚糖、半乳甘露聚糖^[10];Karmali 培养基、YCFA 培养基分别加入 0.05% L-半胱氨酸;YCFA 培养基、Anaerobe Basal Broth 培养基加入 1.5% 琼脂粉配制成固体培养基。

2.2 厌氧菌分离培养、纯化和保存 在超净工作台,取 10 g 新鲜粪便标本,加入 50 mL 磷酸盐缓冲液充分混匀,经纱布过滤后得到粪菌液标本。通过磷酸盐缓冲液对粪菌液从 10^{-4} 到 10^{-8} 进行梯度稀释。分别涂布到配制的不同固体培养基表面,将培养皿于 37℃ 厌氧环境(85% N_2 , 10% CO_2 , 5% H_2)培养 48~72 h。根据菌落大小、色泽、表面和边缘等不同特征挑取具有代表性的单菌落于新的固体培养基进行划线分离培养,重复划线分离培养 3 次。将分离培养获得的菌株进行编号并保藏。

2.3 细菌基因组 DNA 提取及 PCR 扩增 使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取已分离厌氧菌 DNA。用细菌通用引物 27F 和 1492R 扩增 16S rRNA 基因。PCR 扩增体系为 50 μ L:模板 DNA 溶液 1 μ L, 27F 1 μ L, 1492R 1 μ L, dNTP 4 μ L, FastPfu Buffer 10 μ L, FastPfu DNA Polymerase 1 μ L, Nuclease-free Water 32 μ L。PCR 扩增程序为:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 30 s, 52℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环;72℃ 终延伸 5 min。PCR 扩增产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,对于出现大小 1 500 bp 左右、条带清晰的样品进行切胶回收,切胶回收产物送至北京擎科生物科技有限公司进行测序。

2.4 系统发育树构建 将测序得到的序列上传到 NCBI 数据库中进行序列比对,得到同源性较高的序列,并获得序列号。下载与分离株相似的前 5 个菌株序列,将这些分离株的序列以及与其相似的 5 个菌株的序列用 MEGA11 中的 Neighbor-Joining 方法来构建系统发育树,并分析已分离菌株与数据库菌株的亲缘关系。

2.5 有益菌的筛选 通过对已分离的厌氧菌进行分

析比较,最终筛选出长双歧杆菌(BL)、假小链状双歧杆菌(BP)、普通拟杆菌(BV)进行 DSS 诱导小鼠 IBD 做进一步的研究探索。

2.6 IBD 模型建立 20 只 C57BL/6 小鼠简单随机分为对照组(Control 组)、葡聚糖硫酸钠组(DSS 组)、长双歧杆菌治疗组(BL 组)、假小链状双歧杆菌治疗组(BP 组)、普通拟杆菌治疗组(BV 组),每组 4 只。从第 1 d 开始,DSS 组、BL 组、BP 组、BV 组,均给予 2.5% DSS 诱导急性结肠炎,7 d 后更换为过滤除菌水,BL 组、BP 组、BV 组分别于第 4 d 开始进行为期 10 d 的有益菌(4×10^8 CFU)灌胃处理,12 d 处死小鼠取材。Control 组给予正常饮水,其他喂养条件一致。每日固定时间测量体重变化、大便性状和粪便隐血,用于评估每日疾病活动指数(DAI)评分。

2.7 H&E 染色 取距直肠 2 cm 处结肠组织段 1 cm,用 4% 多聚甲醛固定,经脱水、包埋、切片,最后进行 H&E 染色,光学显微镜下观察结肠组织炎症程度、结肠隐窝损伤、病变深度、再生情况,并在 40 倍、200 倍视野下拍照。

3 统计分析

数据来自 4 个独立样本,且所有结果均以平均值(标准误差表示)。多组之间的差异采用单因素方差分析。统计显著性以 $P < 0.05$ 为标准。结果用 GraphPad Prism 10 进行统计分析。

结 果

1 各培养基分离菌株的多样性

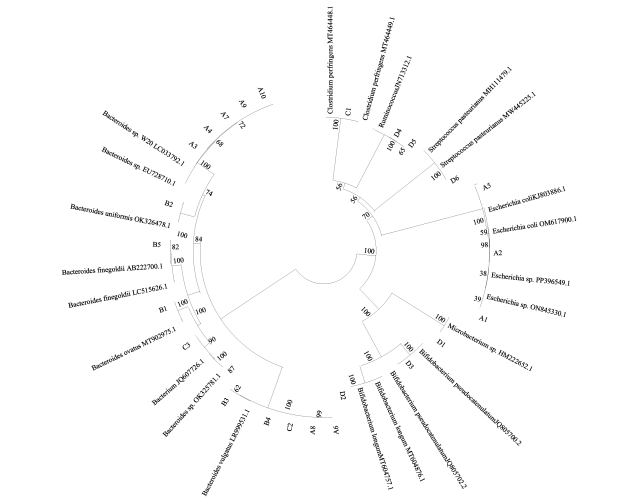
12 种培养基组合共分离获得 79 株细菌。其中,Karmali 系列培养基分离到 24 株细菌,YCFA 系列培养基分离到 30 株细菌,Anaerobe Basal Broth 系列培养基分离到 25 株细菌。共分离培养并鉴定了 16 种细菌分离株,包括 5 个菌门、11 个属和 16 个种。所代表的门有变形菌门,拟杆菌门,厚壁菌门,放线菌门,梭杆菌门。其中以放线菌门和拟杆菌门的菌群为主,分别占分离类群的 48.10% 和 18.99%。在分离纯化过程中,共有 79 个菌落纯化良好并成功测序。其中,46 个菌株与 NCBI 数据库中记录的种类相似性达 100%;32 个菌株与 NCBI 数据库中记录的种类相似性高于 98.65%;1 个菌株与 NCBI 数据库中记录的种类相似性高于 97.0%。

1.1 Karmali 系列培养基细菌分离株的 16SrRNA 基因序列比对及系统发育树分析 Karmali 系列培养基分离培养的人类肠道厌氧菌包括 7 个属,分别是埃希菌属(*Escherichia*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、梭菌属(*Clostridium*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、微

杆菌属(*Microbacterium*)。分离的细菌主要是拟杆菌属和埃希菌属两大类群,还有少量梭菌属、双歧杆菌属等(图 1)。9 株细菌的 16SrRNA 基因与数据库中序列的相似性为 100%,其余细菌的 16SrRNA 基因与数据库中序列的相似性>97.0%(表 1)。

表 1 Karmali 培养基及不同多糖组合培养基分离菌株 16SrRNA 与 GenBank 数据库中最接近序列的相似性比较
Table 1 16S rRNA gene sequences identity between isolates obtained from Karmali Medium with Different Polysaccharide Combinations and their closest relative retrieved from GenBank database

代表性菌株	分离菌株数量	亲缘关系	相似度 (%)	占比 (%)
Karmali-1	1	<i>Escherichia sp.</i> (PP396549.1)	100	10
Karmali-2	2	<i>Escherichia coli</i> (KJ803886.1)	99.86	20
Karmali-3	5	<i>Bacteroides sp.</i> W20(LC033792.1)	99.71	50
Karmali-4	2	<i>Phocaeicola vulgatus</i> (CP081912.1)	100	20
Karmali-dextran-1	1	<i>Bacteroides ovatus</i> (MT902975.1)	99.86	20
Karmali-dextran-2	1	<i>Bacteroides uniformis</i> (CP129143.1)	99.86	20
Karmali-dextran-3	2	<i>Phocaeicola vulgatus</i> (MN081729.1)	99.93	40
Karmali-dextran-4	1	<i>Bacteroides Finegoldii</i> (AP027244.1)	99.79	20
Karmali-arabinogalactan-1	1	<i>Clostridium perfringens</i> (MT464449.1)	100	33
Karmali-arabinogalactan-2	1	<i>Phocaeicola vulgatus</i> (PP512832.1)	100	33
Karmali-arabinogalactan-3	1	<i>Bacteroides sp.</i> (OK325781.1)	97.79	33
Karmali-galactomannan-1	1	<i>Bifidobacterium longum</i> (MT613587.1)	100	17
Karmali-galactomannan-2	1	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> (JQ805702.2)	100	17
Karmali-galactomannan-3	2	<i>Mediterraneibacter gnavus</i> (JN713312.1)	99.71	33
Karmali-galactomannan-4	1	<i>Streptococcus pasteurianus</i> (MH111479.1)	100	17
Karmali-galactomannan-5	1	<i>Microbacterium sp.</i> (HM222652.1)	100	17



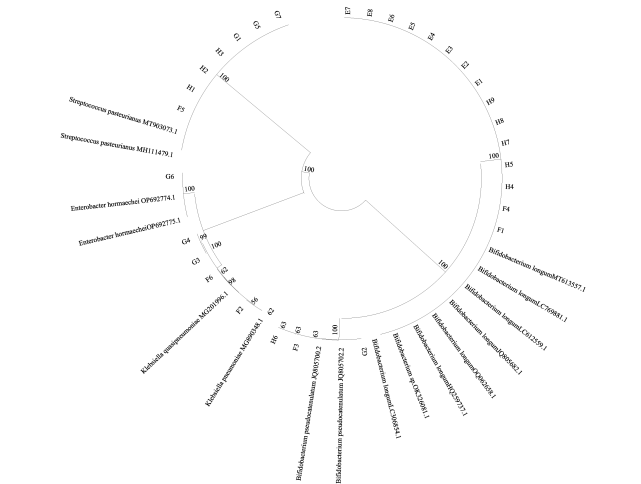
Karmali A1—A10 Karmali+葡聚糖 B1—B5 Karmali+阿拉伯半乳糖 C1—C3 Karmali+半乳甘露聚糖 D1—D6

图 1 Karmali 培养基分离的人类肠道厌氧菌的系统发育树
Fig. 1 Phylogenetic analysis of 16S rRNA genes of strains isolated from human intestinal anaerobes isolated in Karmali medium

1.2 YCFA 系列培养基细菌分离株的 16SrRNA 基因序列比对及系统发育树分析 YCFA 系列培养基分离培养的人类肠道厌氧菌包括 4 个属,分别是双歧杆菌属、克雷伯菌属、链球菌属、肠杆菌属。分离的细菌主要是双歧杆菌属一大类群,还有少量链球菌属和克雷伯菌属等(图 2)。18 株细菌的 16SrRNA 基因与数据库中序列的相似性为 100%,其余细菌的 16SrRNA 基因与数据库中序列的相似性>97.0%(表 2)。

表 2 YCFA 培养基及不同多糖组合培养基分离菌株 16SrRNA 与 GenBank 数据库中最接近序列的相似性比较
Table 2 16S rRNA gene sequences identity between isolates obtained from YCFA Medium with Different Polysaccharide Combinations and their closest relative retrieved from GenBank database

代表性菌株	分离菌株数量	亲缘关系	相似度 (%)	占比 (%)
YCFA-1	8	<i>B. longum subsp. Suillum</i> (LC769881.1)	99.93	100
YCFA-dextran-1	2	<i>B. longum subsp. Suillum</i> (MT613557.1)	100	33
YCFA-dextran-2	2	<i>K. pneumoniae</i> (CP150000.1)	99.93	33
YCFA-dextran-3	1	<i>B. pseudocatenulatum</i> (JQ80570 2.2)	99.86	17
YCFA-dextran-4	1	<i>S. pasteurianus</i> (MH111479.1)	100	17
YCFA-arabinogalactan-1	3	<i>S. pasteurianus</i> (MT573820.1)	100	43
YCFA-arabinogalactan-2	1	<i>B. pseudocatenulatum</i> (KP159607.1)	100	14
YCFA-arabinogalactan-3	2	<i>K. pneumoniae</i> (CP034321.1)	100	29
YCFA-arabinogalactan-4	1	<i>E. hormaechei</i> (CP042540.1)	100	14
YCFA-galactomannan-1	3	<i>S. pasteurianus</i> (MT573820.1)	100	33
YCFA-galactomannan-2	5	<i>B. longum</i> (MT613557.1)	100	56
YCFA-galactomannan-3	1	<i>B. pseudocatenulatum</i> (JQ805702.2)	99.93	11



YCFA E1—E8 YCFA+葡聚糖 F1—F6 YCFA+阿拉伯半乳糖 G1—G7 YCFA+半乳甘露聚糖 H1—H9

图 2 YCFA 培养基分离的人类肠道厌氧菌的系统发育树
Fig. 2 Phylogenetic analysis of 16S rRNA genes of strains isolated from human intestinal anaerobes isolated in YCFA medium

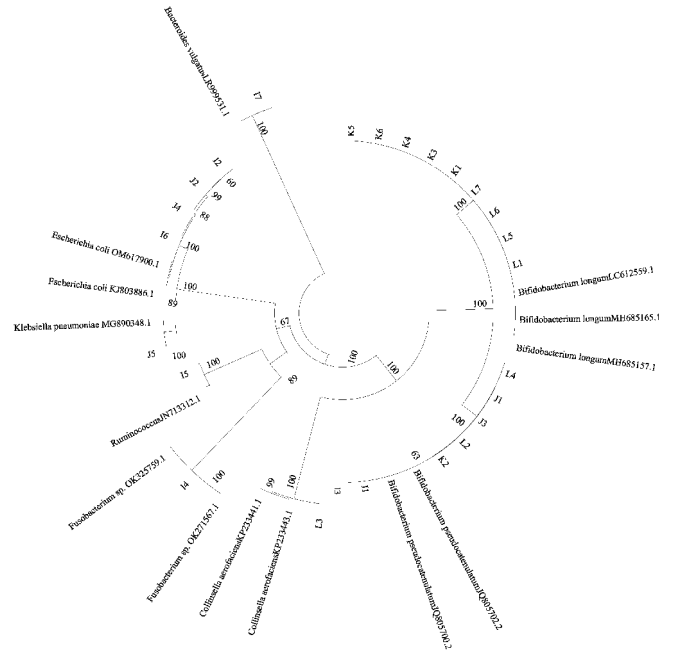
1.3 Anaerobe Basal Broth 系列培养基细菌分离株的 16SrRNA 基因序列比对及系统发育树分析

Anaerobe Basal Broth 系列培养基分离培养的人类肠道厌氧菌包括 7 个属, 分别是双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、埃希菌属 (*Escherichia*)、梭杆菌属 (*Fusobacterium*)、瘤胃球菌属 (*Ruminococcus*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、克雷伯菌属 (*Klebsiella*)、柯林斯菌属 (*Collinsella*)。分离的细菌主要是双歧杆菌属一大类群, 还有少量埃希菌属和梭杆菌属等(图 3)。19 株细菌的 16SrRNA 基因与数据库中序列的相似性为 100%, 其余细菌的 16SrRNA 基因与数据库中序列的相似性>97.0%(表 3)。

表 3 Anaerobe Basal Broth 培养基及不同多糖组合培养基分离菌株 16SrRNA 与 GenBank 数据库中最接近序列的相似性比较
Table 3 16S rRNA gene sequences identity between isolates obtained from Anaerobe Basal Broth Medium with Different Polysaccharide Combinations and their closest relative retrieved from GenBank database

代表性菌株	分离菌株数量	亲缘关系	相似度 (%)	占比 (%)
Anaerobe Basal Broth-1	2	<i>B. pseudocatenulatum</i> (JQ805702.2)	100	29
Anaerobe Basal Broth-2	2	<i>E. coli</i> (CP142590.1)	100	29
Anaerobe Basal Broth-3	1	<i>F. varium</i> (OK325759.1)	100	14
Anaerobe Basal Broth-4	1	<i>M. gnavus</i> (CP043051.1)	99.86	14
Anaerobe Basal Broth-5	1	<i>P. vulgatus</i> (OK510354.1)	99.93	14
Anaerobe Basal Broth + dextran-1	2	<i>B. pseudocatenulatum</i> (JQ805702.2)	100.00	40
Anaerobe Basal Broth + dextran-2	2	<i>E. coli</i> (CP054236.1)	100.00	40
Anaerobe Basal Broth + dextran-3	1	<i>K. pneumoniae</i> (CP125201.1)	100.00	20
Anaerobe Basal Broth + arabinogalactan-1	5	<i>B. longum</i> (LC612559.1)	100.00	83
Anaerobe Basal Broth + arabinogalactan-2	1	<i>B. pseudocatenulatum</i> (JQ805702.2)	99.65	17
Anaerobe Basal Broth + galactomannan-1	4	<i>B. longum</i> (LC612559.1)	100.00	57
Anaerobe Basal Broth + galactomannan-2	2	<i>B. pseudocatenulatum</i> (JQ805702.2)	99.65	29
Anaerobe Basal Broth + galactomannan-3	1	<i>C. aerofaciens</i> (KP233443.1)	99.43	14

3 类培养基在添加不同多糖分离培养的肠道厌氧菌类群的组成及占比结果显示(图 4), 从 Karmali 系列培养基得到的拟杆菌属具有较高的丰度, 特别是在 Karmali 培养基中添加多糖后的培养基组合中, 拟杆菌属的丰度增高; 从 YCFA 系列培养基和 Anaerobe Basal Broth 系列培养基则分离得到了更多的双歧杆菌属。不同培养基组合影响了厌氧菌分离培养的多样性和组成。Karmali 培养基分离出了 7 属 11 种分离菌; YCFA 培养基分离出了 4 属 5 种分离菌; Anaerobe Basal Broth 培养基分离出了 7 属 8 种分离菌。



Anaerobe Basal Broth I1-I7 Anaerobe Basal Broth+葡聚糖 J1-J5 Anaerobe Basal Broth+阿拉伯半乳聚糖 K1-K6 Anaerobe Basal Broth+半乳甘露聚糖 L1-L7

图 3 Anaerobe Basal Broth 培养基分离的人类肠道厌氧菌的系统发育树
Fig. 3 Phylogenetic analysis of 16S rRNA genes of strains isolated from human intestinal anaerobes isolated in Anaerobe Basal Broth medium

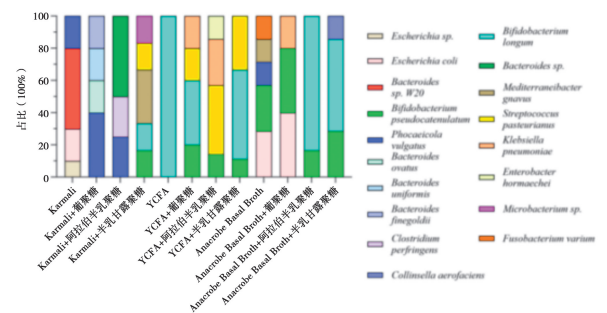
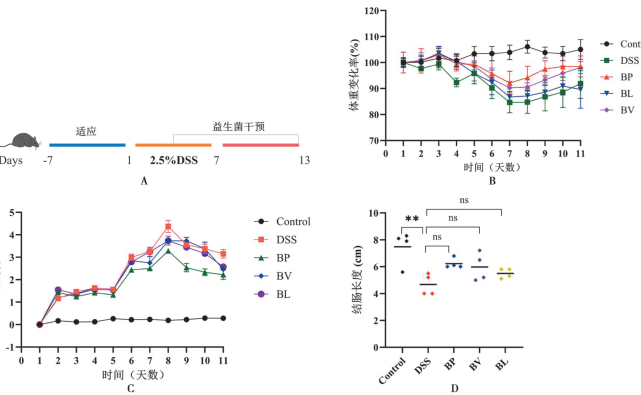


图 4 3 种培养基上分离菌株类群比较
Fig. 4 Comparison of different phylogenetic groups of the isolates obtained from three different medium

单纯 YCFA 培养基最后成功分离纯化的菌种数量最少, 分离出了 8 株 1 种菌株, 菌种不重复率为 12.50%。而其在添加了葡聚糖、阿拉伯半乳聚糖和半乳甘露聚糖之后的培养基组合分离出的细菌属的多样性更丰富, 分别分离出了 6 株 4 种菌株、7 株 4 种菌株、9 株 3 种菌株, 菌种不重复率分别高达 66.67%、57.14% 和 33.33%。Karmali 培养基分离出了 10 株 4 种菌株, 菌种不重复率为 40.0%, 而分别添加不同多糖的培养基组合 Karmali+葡聚糖、Karmali+阿拉伯半乳聚糖、Karmali+半乳甘露聚糖分别分离出了 5 株 4 种菌株、3 株 3 种菌株、6 株 5 种菌株, 菌种不重复率分别高达 80.00%、100.00% 和 83.33%。

2 各肠道有益菌对 DSS 诱导小鼠 IBD 的治疗潜力

2.1 小鼠 IBD 模型建立及指标评估 饮用 DSS 的小鼠出现了不同程度的腹泻便血,且小鼠体重在第 3 d 开始下降,对照组、DSS 组、BL 组、BV 组、BP 组小鼠的初始体重分别为(18.85±0.3)g、(18.48±0.22)g、(18.21±0.26)g、(18.72±0.31)g、(18.25±0.63)g,在有益菌灌胃治疗后,小鼠体重在第 8 d 开始回升,DSS 组、BL 组、BV 组、BP 组的小鼠体重分别为初始体重的 84.75%、87.15%、90.56%、94.21%。BP 组干预对于缓解小鼠体重的下降最为显著($F=3.820$, $P<0.05$ (图 5B))。



A 小鼠灌胃流程图 B 小鼠体重变化情况 C 小鼠 DAI 评分
D 小鼠结肠长度

图 5 不同肠道有益菌对 DSS 诱导结肠炎的改善作用
Fig. 5 Effects of different intestinal beneficial bacteria on DSS-induced colitis

根据每天小鼠的体重变化、粪便粘稠度以及隐血情况监测小鼠 DAI 评分变化,发现在第 8 d,DSS 组、BL 组、BV 组、BP 组的 DAI 评分分别为 4.37±0.23、3.74±0.17、3.73±0.03、3.28±0.09。BP 组的 DAI 评分最低,且随着时间的变化,DAI 的下降趋势也更为明显($F=80.18$, $P<0.05$ (图 5C))。

通过测量每组小鼠的结肠长度发现,对照组、DSS 组、BL 组、BV 组、BP 组小鼠的平均结肠长度分别为(7.48±1.09)cm、(4.68±0.68)cm、(5.5±0.3)cm、(5.97±0.91)cm、(6.23±0.33)cm,BP 组的结肠长度较其他治疗组明显高于 DSS 组($F=5.878$, $P<0.05$ (图 5D))。

2.2 H&E 染色病理评估 利用 H&E 染色评价各组小鼠结肠病理损伤情况,结果如图 6 所示。Control 组结肠组织结构正常,粘膜层上皮细胞排列紧密,未见明显变性脱落,如黑色箭头所示;隐窝数量较多,杯状细胞含量丰富,如绿色箭头所示;组织未见明显炎症细胞浸润。DSS 组损伤程度严重,肠道可见大面积溃疡,炎症细胞及纤维组织显著增多,隐窝及杯状细胞数量减少,如黄色箭头所示。BL 组损伤程度较 DSS 组有所改善,溃疡区域面积减小,炎症细胞及纤维组织有

所减少,隐窝及杯状细胞数量增多,BV 组肠道损伤程度与 BL 组相当;BP 组肠道组织损伤程度较 DSS 组明显改善,粘膜层少部分区域上皮细胞糜烂脱落,隐窝消失,纤维组织及炎症细胞显著减少,如黄色箭头所示;隐窝及杯状细胞数量增多,如红色箭头所示,治疗效果最佳。

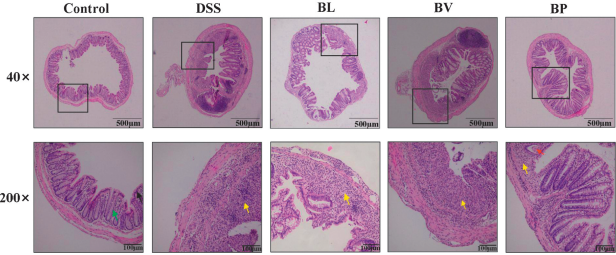


图 6 小鼠结肠组织 H&E
Fig. 6 H&E of mouse colon tissue

讨论

在人类粪便样本中分离培养肠道厌氧菌的过程中,其所得菌种的种类与数量受多种因素的影响,包括厌氧菌特定的营养需求及所采用的培养条件^[11]。肠道微生物对源自宿主的多种多糖,涵盖简单聚糖至复杂的半纤维素多糖(如葡聚糖、阿拉伯半乳聚糖、甘露聚糖),展现出了高效的代谢活性^[12]。通过对不同培养基的分离结果比较,发现所采用的不同系列培养基之间结果存在差异。添加特定多糖的基础培养基提高了菌种的分离效率和多样性,所采用的培养基配方以及培养条件有利于获得种类丰富的肠道有益菌。Karmali 系列培养基与拟杆菌属丰富度增加有关;YCFA 系列培养基与长双歧杆菌丰富度增加有关;Anaerobe Basal Broth 系列培养基与假小链状双歧杆菌丰富度增加有关。Martens 等^[13]研究结果也表明,具备广泛聚糖利用潜力的不同菌株在特定复合碳水化合物代谢方面存在显著差异,表现出多糖依赖性的细菌利用模式。此外,已有研究证明细菌对多糖的利用特点表现在 3 个层面上:酶、转运和调控^[14]。细菌通过对各种多糖和蛋白质的降解利用,从而为自身生长提供充足的碳源和能量^[15]。因此,在不同的基础培养基添加多糖后,有效促进了肠道厌氧菌的生长,还显著提高了培养产物的多样性。

多种肠道有益菌已被证实对 IBD 具有治疗潜力。双歧杆菌、拟杆菌、乳酸杆菌、嗜黏蛋白阿克曼菌都在预防和治疗 IBD 方面具有一定效果^[16]。这些有益菌对结肠炎小鼠的黏液杯状细胞和上皮细胞层具有关键的保护作用^[17]。然而,不同的菌株之间治疗效果也有一定的差异,例如,不同嗜酸乳杆菌菌株对结肠炎有不同的治疗效果^[18];Li 等^[19]探讨了四种婴儿长双歧杆菌亚种对结肠炎的改善作用,主要包括减少肠道屏障

的损伤、调节炎性细胞因子、上调丁酸和缓解肠道微生物群紊乱。不同菌株之间的治疗差异在此研究得到了验证,相较于长双歧杆菌,假小链状双歧杆菌对于小鼠 IBD 的预防和治疗效果都更为显著。在使用肠道有益菌对 IBD 小鼠治疗后,小鼠体重上升、结肠长度增加,DAI 评分下降,且肠道粘膜层隐窝及杯状细胞数量增多,炎症细胞浸润不明显^[20]。本研究通过对比不同双歧杆菌亚种的疗效差异,明确了菌株特异性对 IBD 治疗效果的影响。研究表明,假小链状双歧杆菌在小鼠 IBD 治疗中可能涉及多个作用机制,包括通过厌氧降解膳食纤维等物质为短链脂肪酸,为肠道细胞供能,助力黏膜修复与炎症缓解;利用竞争性排斥降低肠道有害菌及毒素水平,维持肠道微生态平衡;激活免疫细胞,抑制促炎因子、促进抗炎相关物质分泌,减轻肠道炎症反应^[21]。此外,多项研究已证实,假小链状双歧杆菌的多个菌株展现出显著的益生特性,包括调节机体免疫功能以及改善衰老^[22]和抑郁症状等,进一步揭示了其在促进宿主健康方面的潜力。因此,通过分离多样的有益菌株,探索其在 IBD 中的治疗潜力,对研究肠道有益菌的作用机制具有重要意义。

综上所述,本研究通过优化培养基,成功分离并鉴定出多种肠道厌氧菌,并筛选出具有显著 IBD 治疗潜力的假小链状双歧杆菌。以一种新的视角深入了解了肠道微生物的代谢特性,为开发基于肠道有益菌的 IBD 治疗策略提供了实验支持。

【参考文献】

- [1] Singh N, Bernstein CN. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease [J]. United European Gastroenterol J, 2022, 10(10):1047-1053.
- [2] Lu Q, Yang MF, Liang YJ, et al. Immunology of inflammatory bowel disease: molecular mechanisms and therapeutics [J]. J Inflamm Res, 2022, 15:1825-1844.
- [3] Quaglio AEV, Grillo TG, De Oliveira E CS, et al. Gut microbiota, inflammatory bowel disease and colorectal cancer [J]. World J Gastroenterol, 2022, 28(30):4053-4060.
- [4] Celiberto LS, Bedani R, Rossi EA, et al. Probiotics: the scientific evidence in the context of inflammatory bowel disease [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2017, 57(9):1759-1768.
- [5] 玉霞, 赵飞燕, 孙志宏. 肠道中有益菌培养组学的研究进展 [J]. 食品科学, 2023, 44(23):365-371.
- [6] 承磊, 马诗淳, 巫可佳, 等. 厌氧微生物培养分离: 过去、现在和未来 [J]. 微生物学报, 2021, 61(4):946-968.
- [7] Holscher HD. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota [J]. Gut Microbes, 2017, 8(2):172-184.
- [8] Ziemer CJ. Newly cultured bacteria with broad diversity isolated from eight-week continuous culture enrichments of cow feces on complex polysaccharides [J]. Appl Environ Microbiol, 2014, 80(2):574-585.
- [9] 莫潜渊, 肖德琴, 朱勇文, 等. 肠道微生物降解植物多糖的机制研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(10):4058-4069.
- [10] Moote PE, Bescucci DM, Ortega Polo R, et al. Comparison of strategies for isolating anaerobic bacteria from the porcine intestine [J]. Appl Environ Microbiol, 2021, 87(9):e00088-21.
- [11] Börner RA. Isolation and cultivation of anaerobes [J]. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2016, 156:35-53.
- [12] Cartmell A, Mu oz-Mu oz J, Briggs JA, et al. Author correction: A surface endogalactanase in *Bacteroides thetaiotaomicron* confers keystone status for arabinogalactan degradation [J]. Nat Microbiol, 2019, 4(11):2021-2023.
- [13] Martens EC, Lowe EC, Chiang H, et al. Recognition and degradation of plant cell wall polysaccharides by two human gut symbionts [J]. PLoS Biol, 2011, 9(12):e1001221.
- [14] Flint HJ, Bayer EA, Rincon MT, et al. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis [J]. Nat Rev Microbiol, 2008, 6(2):121-131.
- [15] Ose R, Hirano K, Maeno S, et al. The ability of human intestinal anaerobes to metabolize different oligosaccharides: Novel means for microbiota modulation? [J]. Anaerobe, 2018, 51:110-119.
- [16] Fan L, Qi Y, Qu S, et al. *B. adolescentis* ameliorates chronic colitis by regulating Treg/Th2 response and gut microbiota remodeling [J]. Gut Microbes, 2021, 13(1):1-17.
- [17] Coqueiro AY, Raizel R, Bonvini A, et al. Probiotics for inflammatory bowel diseases: a promising adjuvant treatment [J]. Int J Food Sci Nutr, 2019, 70(1):20-29.
- [18] Huang Z, Gong L, Jin Y, et al. Different effects of different lactobacillus acidophilus strains on DSS-induced colitis [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(23):14841.
- [19] Li M, Ding J, Stanton C, et al. *Bifidobacterium longum* subsp. infantis FJSYZ1M3 ameliorates DSS-induced colitis by maintaining the intestinal barrier, regulating inflammatory cytokines, and modifying gut microbiota [J]. Food Funct, 2023, 14(1):354-368.
- [20] Zhang C, Zhao Y, Jiang J, et al. Identification of the key characteristics of *Bifidobacterium longum* strains for the alleviation of ulcerative colitis [J]. Food Funct, 2021, 12(8):3476-3492.
- [21] Chen Y, Yang B, Stanton C, et al. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ameliorates DSS-induced colitis by maintaining intestinal mechanical barrier, blocking proinflammatory cytokines, inhibiting TLR4/NF- κ B signaling, and altering gut microbiota [J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(5):1496-1512.
- [22] Zeng Q, Qi Z, He X, et al. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* NCU-08 ameliorated senescence via modulation of the AMPK/Sirt1 signaling pathway and gut microbiota in mice [J]. Food Funct, 2024, 15(8):4095-4108.

【收稿日期】 2025-02-12 【修回日期】 2025-05-06