

双乙酸钠对小鼠肠道菌群结构和功能的影响

孙东方, 王 晨, 刘 颖*, 王雅玲, 房志家, 邓 旗, 孙力军*

(广东海洋大学食品科技学院 广东海洋大学现代生物化学实验中心, 广东 湛江 524088)

摘 要 肠道菌群在功能和代谢方面的研究日益成熟,但针对食品添加剂双乙酸钠对人体肠道菌群作用的研究目前仍鲜少有报道。为了探究其对肠道菌群及人体健康的潜在益处及危害,以小鼠为模型,以双乙酸钠为干预物质,干预剂量为0.3 g/(kg·d),干预1周后,收集实验小鼠和空白对照组小鼠的粪便并用菌群16S rDNA高通量测序进行肠道菌群的物种鉴定和丰度检测。对所得数据进行分析,得到小鼠肠道菌群的多样性与丰度比例等指标。结果显示,实验剂量下的双乙酸钠干预后,小鼠的肠道菌群无论是菌群种类还是丰度都有了显著改变,属水平新增447种,减少142种。根据丰度比例变化最显著的9种菌,如拟杆菌属(*Bacteroides*)、AKK(*Akkermansia*)等,并结合菌群代谢功能预测,脂肪酸合成显著上调,碳水化合物代谢、氨基酸代谢、脂代谢等明显下调,推测摄入高剂量的双乙酸钠可能有增加肥胖、过敏、慢性炎症和肠胃炎的风险。

关键词 双乙酸钠;肠道菌群;小鼠;慢性炎症

中图分类号 Q93-337

文献标识码 A

文章编号 1005-7021(2020)02-0057-08

doi:10.3969/j.issn.1005-7021.2020.02.007

Effects of Sodium Diacetate on the Structure and Function of Mice Intestines Microbial Community

SUN Dong-fang, WANG Chen, LIU Ying, WANG Ya-ling, FANG Zhi-jia, DENG Qi, SUN Li-jun

(Coll. of Food Sci. & Technol., Mod. Biochem. Exp. Ctr., Guangdong Ocean Uni., Zhanjiang 524088)

Abstract The research on the function and metabolism of intestines microbial community (IMC) is becoming more and more mature, but the study on the effect of food additive sodium diacetate on human IMC is still rarely reported. In order to explore the potential benefits and harms of sodium diacetate on IMC and human health, this study used mice as models, sodium diacetate was used as the intervener (the intervention dose was 0.3 g/(kg·d)). One week after the intervention, feces of experimental group and control group were collected, and 16S rDNA high-throughput sequencing was used for species identification and abundance detection of the IMC. Data analysis had gained the IMC diversity and abundance ratio and other indices. The results showed that after the intervention of sodium diacetate at the experimental dose, the IMC of mice had significant changes in both species and abundance. with 447 species added and 142 species decreased at the genus level. According to the change of abundance ratio, the most significant changes of 9 species of bacteria, such as *Bacteroides*, *Akkermansia*, etc, combined with the prediction of bacterial metabolism function, fatty acid synthesis was significantly up-regulated, and carbohydrate metabolism, amino acid metabolism and lipid metabolism were significantly down-regulated. It was speculated that the high dosage intake of sodium diacetate in may increase the risk of obesity and allergy, chronic inflammation, and gastroenteritis.

Keywords sodium diacetate; intestinal microbial community (IMC); mice; chronic inflammation

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31871898);广东省现代农业产业共性关键技术研发创新团队建设项目-水产品质量安全与环境协调关键技术团队项目(2019KJ151)

作者简介:孙东方 男,硕士研究生。研究方向为食品质量与安全。E-mail:406662864@qq.com

* 通讯作者。刘颖,女,教授,博士,博士生导师。研究方向为水产品质量与安全。E-mail:406662864@qq.com

孙力军,男,教授,博士,博士生导师。研究方向为水产品质量与安全。E-mail:suncamt@126.com

收稿日期:2019-09-19

肠道菌群是定植于宿主胃肠道的上千种不同细菌的集合体,由相互交流和相互制约的复杂菌群构成,是一个关联紧密的微生物生态系统。目前推算,人体肠道中的细菌种类达1 000多种,数量高达 10^{14} ,总数约是人体体细胞的10多倍^[1]。由于绝大部分肠道细菌属于极端厌氧菌,采用最先进的厌氧纯化技术也只能分离纯化培养所有肠道细菌中的30%。随着分子微生物生态学技术的发展,特别是DNA测序和基于细菌16S rDNA分类系统的建立,人们能够对这些未培养的细菌进行功能和代谢特点的研究。近年的研究表明,肠道菌群对于维持人体健康的重要性得到越来越多的重视和研究,认为肠道菌群是一个被遗忘的“器官”,它们参与调节宿主多方面的生理机能,包括消化^[1-2]、营养代谢、天然免疫系统成熟等^[3-4]。肠道菌群失调则会导致肥胖、糖尿病、炎症肠病、阿尔茨海默病、抑郁症、老年痴呆等多种慢性疾病^[5-7]。双乙酸钠(Sodium diacetate, SDA),小鼠LD₅₀为3.31 g/kg,无明显毒性,是一种性质稳定、价格低廉的新型食品防腐剂、酸味剂、改良剂和饲料防霉剂,目前在食品和动物养殖领域得到广泛应用^[8-9]。由于双乙酸钠具有良好的抗细菌和抗真菌作用,而且在消化道中易于被分解成乙酸并解离出H⁺,可以使肠胃中的pH值下降。因此,必然对肠道菌群产生扰动,进而可能影响到机体健康。目前国内外关于双乙酸钠对动物机体健康作用的探究,多以养殖动物为实验对象,考察对动物促生长和防病的作用^[10]。而作为食品添加剂的毒理学评价也只停留在半数致死量、亚慢性毒性等常规毒理学研究方面,基于以上常规毒理学实验,中国和美国食品与药品管理局把双乙酸钠认定为安全物质^[11]。然而,上述对双乙酸钠的安全性评定仅仅是依据于常规毒理学实验,并不能完全反映对动物代谢及慢性疾病的影响,特别是高剂量条件下的影响。目前针对双乙酸钠对肠道菌群产生扰动的研究仍鲜有报道。本研究拟以国家标准GB 25538-2010中双乙酸钠在主食中最大允许添加量为0.1%(相当于小鼠0.3 g/(kg·d)口服剂量)连续灌胃小鼠1周,收集小鼠粪便,通过菌群16S rDNA高通量测序法对干预前后肠道菌群种类和相对丰度进行检测,考察其对小鼠肠道菌群结构和功能的影响,为进一步更全面地认

识双乙酸钠对人体健康的影响提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 动物实验方案遵照广东海洋大学动物实验伦理委员会的相关规定制定执行。实验使用SPF级6周龄雌性C57BL/6J小鼠,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证批号:SCXK(京)2016-0002)。实验动物被单独饲养在笼中,期间可以自由获取⁶⁰Co辐照灭菌的全价配合饲料(营养成分按照GB 14924.3-2001要求)和无菌水,饲养环境温度为20~25℃,相对湿度为40%~70%,明暗循环周期为12 h,压力梯度为20~50 Pa,全新风,单向流动。严格按照广东海洋大学实验动物中心(SYXK2014-0053)操作规范,水瓶、笼子、垫料等经高压蒸汽灭菌,每周进行3次换水瓶和更换垫料。

1.1.2 试剂 双乙酸钠为食品级(纯度99%),购自深圳安泰生物科技有限公司。

1.1.3 仪器与amp;设备 高通量测序仪(Miseq型,Illumina公司);超低温冰箱(TSX型,美国赛默飞世尔科技公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物的处理 购买实验小鼠后,先使用普通饲料同笼喂养1周,以确保小鼠适应饲养环境,并达到相似的肠道菌群基础水平。之后将小鼠随机分为2组,第1组3只小鼠为干预组,灌胃0.3 g/(kg·d)双乙酸钠,持续7 d;第2组3只小鼠为空白对照组,灌胃无菌水,持续7 d。

1.2.2 粪便样本的采集 对小鼠采用常规抓取、按摩腹部的方法,在洁净台中采集新鲜粪便颗粒到无菌Ep管中,采集后即刻冰浴,直至转入-80℃冰箱中待用。每只小鼠至少采集3颗粪便颗粒,一次采集不足者,可以在同一天的多个时间点反复采集。

1.2.3 Illumina高通量16S rDNA测序 质量合格的DNA样本使用谷禾信息技术有限公司的Illumina Novaseq6000高通量测序平台进行测序,按照其标准化程序进行。首先对样本DNA用Covaris超声波破碎仪随机打断成长度约为350 bp的片段,经末端修复、加A尾、加测序接头、纯化、PCR扩增等步骤完成整个文库制备。然后使用

Qubit 2.0 进行初步定量,将文库稀释至 2 ng/L,随后使用 Agilent 2100 对文库的 insert size 进行检测,并使用 Q-PCR 方法对文库的有效浓度进行准确定量,最后把不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求 pooling 后进行测序。

1.2.4 测序数据处理 首先对下机数据进行质控,去除小于 40 bp 的 reads,去除 N 碱基含量超过 10 bp 的 reads,去除与测序接头序列 overlap 超过 15 bp 的 reads,再采用 Bowtie2 软件比对小鼠数据库、过滤掉源自小鼠(宿主)的 reads,得到有效数据(Clean Data)。质控获得的 Clean Data,进一步使用 SOAP denovo 软件进行组装(K-mer 设定为 55),得到 Scaffolds 序列,再将 Scaffolds 序列从 N 连接处打断,得到不含 N 的 Scaffigs 序列(各样本的 Clean Data 序列用 Bowtie2 软件比对至该 Scaffigs 序列,找出未被利用上的 reads,将这些 reads 进行混合组装,然后再进一步获得相应的 Scaffigs 序列),过滤掉 500 bp 以下的片段,余下的 Scaffigs 序列片段进一步用 MetaGeneMark 软件进行 Open Reading Frame 预测和过滤,并用 CD-HIT 软件进行去冗余。以去冗余得到的代表性片段为基准,用 Clean Data 结果去比对,获得各基因片段在各样本中的 reads 数,然后过滤掉 reads 数不超过 2 个的基因片段,余下的 Clean Data 片段,组成了 Unigenes 列表,用于计算基因丰度等信息,并比对 KEGG 数据库,进行代谢通路的功能注释和丰度分析。测序原始数据上传至 NCBI 的 Sequence Read Archive (SRA)数据库,序列号 SRP192980。

1.2.5 统计分析 基于 Unigenes 列表中各基因在各样本中的丰度信息,进行基本信息统计,基因数目韦恩图分析。基于各样本在各个分类层级上的丰度,进行 PCA 分析,组间差异物种进行 Metastat 统计分析(以 $P < 0.05$ 作为统计学显著性,以 $P < 0.05$ 进行校正筛选)。其余指标进行双端非参数 t 检验,以 $P < 0.05$ 作为统计学显著性。

2 结果与分析

2.1 稀释曲线

通过 OTU 丰度矩阵,计算样本的群落多样性(Alpha 多样性)绘制稀释曲线,稀释曲线通过从每个样本中随机抽取 n 个序列(n 小于测得 reads 序列总数),然后根据一组 n 值,与其相对应的

OTU 数量的期望值做出曲线。图 1 中,每条线代表一个样本,横坐标为从一个样本中随机抽取的序列数,从图 1 中可判断刚开始时曲线呈现指数上升,表明测序条数远不足以覆盖样本中的生物种类,随着测序深度的增加,被检测到的 OTU 数量也逐渐增加,当在 5 000 sequences 时大多数曲线出现拐点,并在 10 000 sequences 时稀释曲线趋于平缓,说明此时测序已经能够完全覆盖样本中的微生物群落。由于本研究所有样品的测序数量都在 20 000 sequences 以上,表明本研究测序深度足够,已经基本覆盖该肠道内容物的群落微生物多样性和所有物种,数据准确可靠。

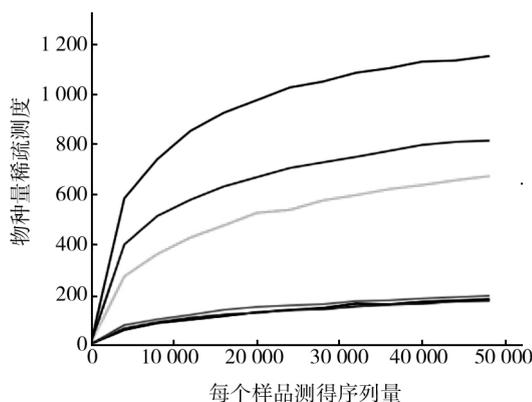


图 1 小鼠肠道菌群物种多样性 Alpha 指数的稀释曲线图

Fig. 1 Alpha index rarefaction curve of intestinal flora in mice

2.2 双乙酸钠干预对小鼠肠道菌群 Alpha 多样性的影响

如表 1 所示,实验组的 Goods coverage 数值全部在 99.88% 以上,对照组的全部在 99.93% 以上,符合要求。证明此次测序的数据量足够,测序结果能代表样本的真实情况。

实验结果如表 1 所示,实验组无论是 Shannon 指数还是 Simpson 指数都比对照组有显著提高($P < 0.05$)。其中 Shannon 指数更为显著,平均值水平下增长至对照组的 3.13 倍。Simpson 指数在平均值水平下提高至 1.65 倍。两个数值都说明实验组的肠道菌群多样性比对照组明显提高($P < 0.05$)。实验组的 Chao1 指数和 Ace 指数对比对照组均有显著提高($P < 0.05$)。实验组 Chao1 指数平均值增长至对照组的 3.91 倍, Ace 指数平均值增长至对照组的 3.69 倍。两个数值

大幅增加,说明实验组的肠道菌群丰度比对照组有明显提高。

表 1 双乙酸钠干预下小鼠肠道菌群 Alpha 多样性指数

Table 1 Alpha diversity index of mice gut flora under the intervention of sodium diacetate

组分	Shannon	Simpson	Chao1	Ace	Goods coverage
SDA3	6.188 1	0.955 4	1 020.176 0	1 004.503 0	0.998 6
SDA2	7.451 2	0.982 3	1 317.797 0	1 282.353 0	0.999 0
SDA1	5.289 2	0.936 5	936.811 1	917.291 6	0.998 8
C2	2.083 6	0.613 0	259.600 0	268.728 8	0.999 4
C1	1.795 3	0.532 9	317.122 4	336.646 5	0.999 5
C3	2.183 4	0.595 6	260.454 5	261.896 5	0.999 7
SDA \bar{X}	6.309 5	0.958 0	1 091.595 0	1 068.049 0	0.998 8
C \bar{X}	2.020 8	0.580 5	279.059 0	289.090 6	0.999 5

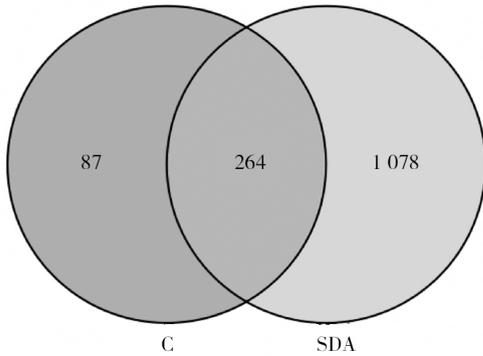


图 2 实验组与对照组的小鼠肠道内容物 DNA 样品 OTU 的比较韦恩图

Fig. 2 Venn diagram comparison of OTU between intestinal contents of mice in the experimental group and the control group

OTU (Operational Taxonomic Units) 是在微生物生态学领域当中,为便于分析人为设置的一个分类单位阈值,将高于这一阈值的序列归为一个 OTU,相似的序列进行归类。利用 Usearch 软件将拼接好的 Clean Tags 在相似度 97% 的水平上进行生物学统计,该水平相当于分类学上的物种 (Species) 水平,OTU 的数量初步说明了样本的物种丰富程度。

实验组 (SDA) 与对照组 (C) 小鼠肠道菌群之间的 OTU 数比较如图 2 所示,双乙酸钠干预后的实验组,其肠道内容物 DNA 样品测得的 OTU 与对照组相比,有 87 个 OTU 在干预后显著性减少,1 078 个 OTU 在干预后显著性增加 ($P < 0.05$)。两相比较下,干预后的 OTU 增加了 991 个。实验组总 OTU 为 1 342 个,而对照组总 OTU 只有 351

个,前者是后者的 3.81 倍。双乙酸钠干预小鼠使 1 078 个 OTU 发生改变,占实验组总 OTU 的 80.32%。而 OTU 的数量初步说明了样本的物种丰富程度。由此可知,双乙酸钠干预小鼠后,对小鼠肠道菌群结构的影响极为明显,OTU 数量的极显著增加说明双乙酸钠的干预会使得样本的物种丰富程度有极明显提高 ($P < 0.05$)。

2.3 双乙酸钠干预对小鼠肠道菌群 Beta 多样性的影响

主坐标分析 PCoA 通过一系列的特征值和特征向量进行排序后,对样本距离矩阵作降维处理,从而简化数据结构,展现样本在某种特定距离的分布。应用 PCoA 分析法可以明确数据中最具有代表性的组分,从而去除多余的因素,揭示隐藏在测序数据背后的分类规律。

本研究将测序获得的所有序列按照 97% 相似度进行 OTU 分类,将众多的肠道菌群组分进行分类、合并,基于加权 Spearman 距离进行 PCoA 分析,并选取最具代表菌群的因素为主坐标轴进行作图,通过 PCoA 图展现所测样品肠道菌群结构的相似性和差异性。如果样本的距离越接近 (即物种的丰度和构成越相似),则它们在 PCoA 图中的距离越近。

如图 3 所示,PC1 为第一主坐标,对小鼠肠道菌群的代表性为 77.5%。纵坐标为 PC2,其代表性为 10.25%。

组间分析:由图 3A 可知,对照组和实验组的整体距离较大,说明两个组间的小鼠肠道菌群存在较大差异。从 PC1 角度观察 (图 3B),距离差

异极为明显,说明从这一角度看小鼠组间的物种的丰度和构成差异性极为显著($P < 0.05$)。从 PC2 角度观察(图 3C),距离差异小。说明从这一角度看小鼠的肠道菌群存在着一定程度上的相似性。综合 A、B、C 三个图,可知双乙酸钠干预后小鼠组间物种的丰度和构成差异性较大,存在相似性。

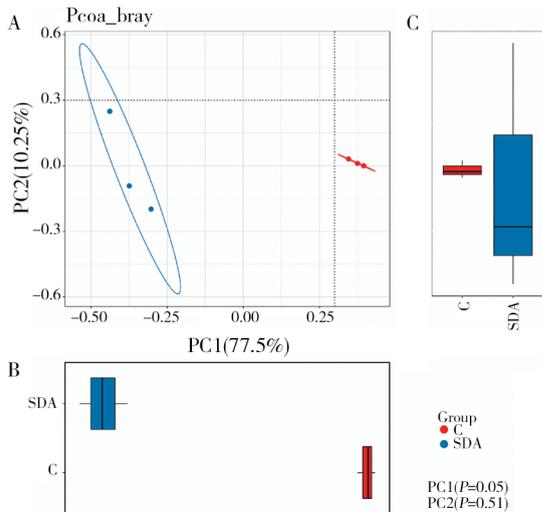


图 3 双乙酸钠实验组与对照组的小鼠肠道菌群结构的 PCoA 分析

Fig. 3 PCoA analysis of intestinal flora structure of mice in the experimental group and the control group

组内分析:图 3A 中对照组的小鼠肠道菌群样品在右下象限,聚集程度高,说明对照组组内小鼠的肠道菌群差异不大。而双乙酸钠实验组的小鼠肠道菌群样品在左上象限,聚集程度一般,说明双乙酸钠实验组内样品的肠道菌群构成存在一定区别。聚集程度可由图 3C 和图 3B 来直观得出,对照组组内 3 个样品距离(即 3 条平行线距离)小,物种丰度和构成相似。实验组组内 3 个样品距离(即 3 条平行线距离)相对大,PC1 角度尚好,组内差异小。但 PC2 角度观察组内差异较为明显。综合 A、B、C 三个图,可知干预后小鼠肠道菌群的变化方向大体一致但有少许不同,组内距离小也证明了数据的稳定性较高。

结合组间和组内分析来看,PCoA 分析下的小鼠肠道菌群的 Beta 多样性,实验组和对照组的组间距离明显,组内距离相对较小。前者说明双乙酸钠干预下小鼠肠道菌群的 Beta 多样性差异较为显著($P < 0.05$),后者说明数据的稳定性较高。

2.4 双乙酸钠干预后小鼠肠道菌群在门水平下的差异比较

对小鼠肠道菌群在门水平上进行分析,结果如图 4 所示,两组小鼠肠道微生物均具有 3 类优势菌门(丰度 $> 1\%$),分别是拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌门(Proteobacteria),这 3 类菌群共同所占比例达到 90% 以上。其中,对比对照组和实验组可发现,除了蓝细菌门(Cyanobacteria)变化不大,拟杆菌门、柔壁菌门(Tenericutes)和一些其他菌门(Unassigned; Other)所占比例增加外,其余菌门占比例均有明显下降。具体表现为拟杆菌门的丰度比例平均增加至对照组的 3.5 倍,柔壁菌门从未测出增加到 0.212 2%,其他未知菌门从未测出增加到 0.328 6%。厚壁菌门的丰度比例平均下降至 73.04%,变形菌门平均下降至以 10.26%,放线菌门(Actinobacteria)平均下降至对照组的 51.17%,疣微菌门(Verrucomicrobia)平均下降至对照组的 23.39%,梭菌门(Fusobacteria)平均下降至 13.65%,互养菌门(Synergistetes)平均下降至对照组的 14.75%,异常球菌门(Deinococcus-Thermus)平均下降至 14.91%。

结合数据可知,灌胃双乙酸钠的小鼠肠道菌群在门水平上,优势菌门的种类变化不大,但丰度比例都有明显变化。相对比对照组,双乙酸钠干预组的拟杆菌门大幅度增加,占绝对优势($> 50\%$),厚壁菌门和变形菌门显著减少($P < 0.05$)。实验组内厚壁菌门和拟杆菌门共同所占比例达 93% 以上,对照组内则是厚壁菌门、拟杆菌门和变形菌门三者占主导。非优势菌门中,除蓝细菌门相对稳定,柔壁菌门和其他菌门的丰度比例增加外,其余菌门显著减少($P < 0.05$)。总体而言,双乙酸钠在门水平上对小鼠肠道菌群的丰度影响较大。

2.5 双乙酸钠干预前后小鼠肠道菌群在属水平下的差异比较

对小鼠肠道菌群在属水平上进行分析,结果如图 5 所示。显著降低的菌属:拟杆菌属(Bacteroides)降低至对照组的 33.45%,AKK 菌属(Akkermansia)降低至对照组的 9.09% ($P < 0.05$),Blautia 降低至对照组的 0.17% ($P < 0.05$),不动菌属(Acinetobacter)显著降低为对照组的 4.27%

($P < 0.05$)。显著升高的菌属:普氏菌属(*Prevotella*)提高至对照组的 2 倍,颤螺旋菌属(*Oscillospira*)提高至对照组的 32.67 倍,脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)从未测出提高至 0.005 34, *Odori-*

bacter 提高至对照组的 235 倍, *Adlercreutzia* 从未测出提高至 0.00534, *Dorea* 提高至对照组的 4.7 倍,瘤胃菌属(*Ruminococcus*)提高至对照组的 9 倍。

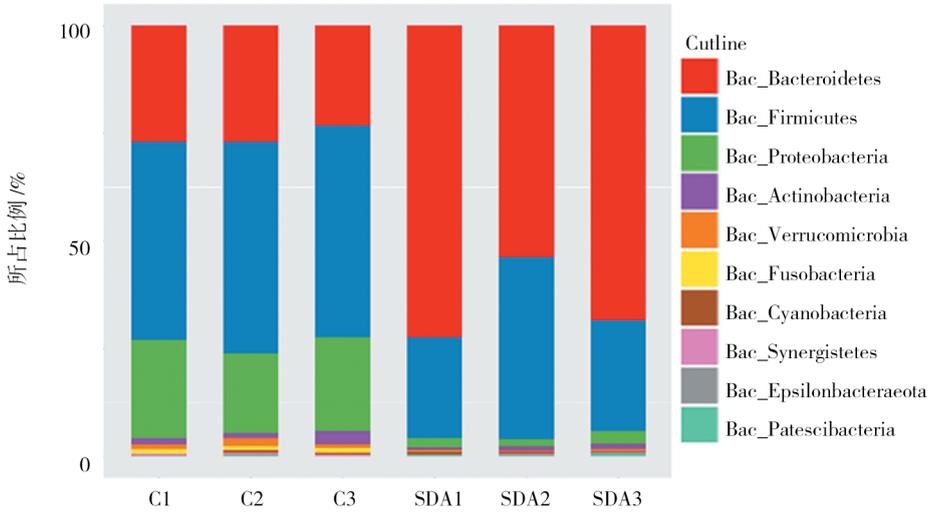


图 4 双乙酸钠实验组与对照组的小鼠肠道菌群在门水平下的构成

Fig. 4 The composition of intestinal flora of mice in the experimental group and the control group at the phylum level

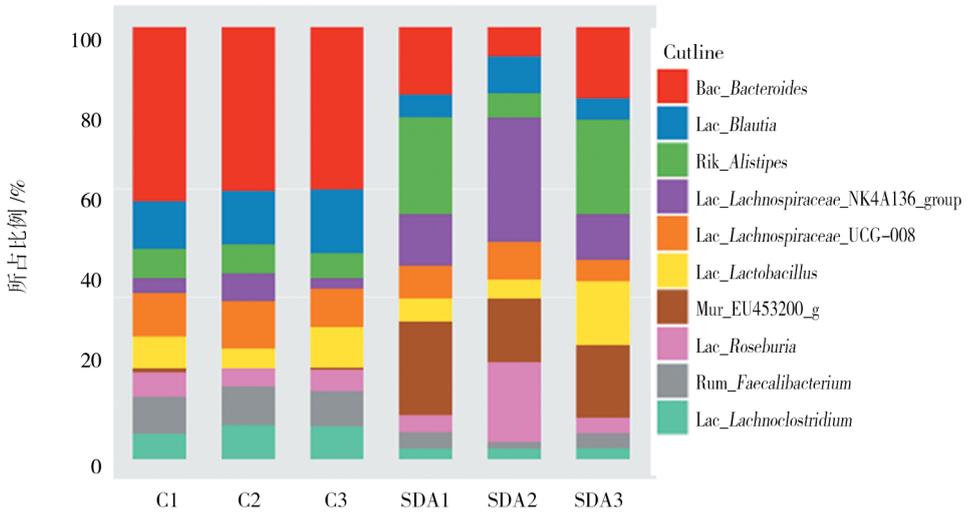


图 5 实验组与对照组的小鼠肠道菌群在属水平下的构成

Fig. 5 The composition of intestinal flora of mice in the experimental group and the control group at the genus level

与对照组相比,实验组小鼠肠道菌群在属水平从组成到丰度均有极大地改变。新增测出菌属 447 种,而降至未测出的菌属有 142 种,整体来看菌群种类显著增加($P < 0.05$)。与此相对,占丰度比例较大的几种菌属如拟杆菌属、AKK 菌属等所占比例都有大幅度的下降。其中本来相对丰度

较低菌属的所占比例有了大幅度升高。由此可见,双乙酸钠在属水平上对小鼠肠道菌群的组成和丰度有明显影响。

2.6 双乙酸钠干预后小鼠菌群代谢功能预测分析

本研究采用基于预测细菌 KEGG 途径的

PICRUSt 和 STAMP 差异分析, 评估不同食品处理组小鼠肠道菌群代谢功能的差异性。结果如图 6 所示, 双乙酸钠组在一级分类水平 (Level 1) 下发生显著改变的生物代谢途径包括新陈代谢、遗传

信息处理及有机系统。进一步细化分类, 在 Level 2~3 下共同改变的包括隶属于新陈代谢的能量代谢、碳水化合物代谢、脂代谢、核苷酸代谢和氨基酸代谢途径、隶属于遗传信息处理的翻译等。

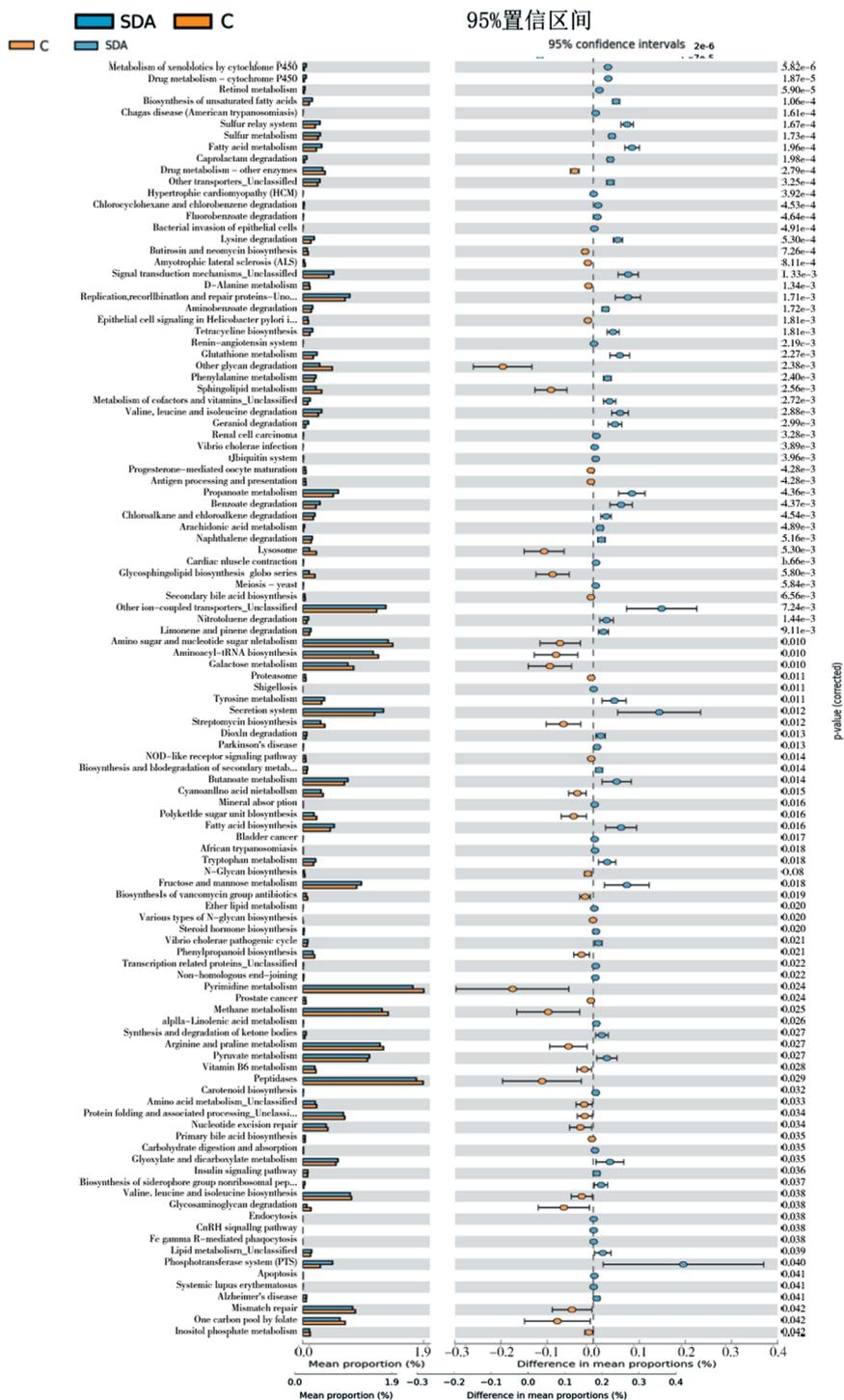


图 6 实验组与对照组的小鼠肠道菌群代谢功能分析

万方数据 the metabolic function prediction analysis of flora of mice in the experimental group and the control group

对双乙酸钠组与对照组代谢途径差异分析,发现干预后显著性上调的代谢途径富集在碳水化合物代谢(果糖和甘露糖代谢)、脂质代谢(脂肪酸合成)、酶代谢(蛋白酶代谢)、膜转运(磷酸转移酶系统、其他未分类的离子耦合转运体)等($P < 0.05$)。显著性下调的代谢途径富集在核苷酸代谢(嘧啶代谢)、碳水化合物代谢(氨基糖和核苷酸糖代谢、半乳糖代谢)、翻译(氨酰生物合成)、能量代谢(甲烷代谢)、氨基酸代谢(精氨酸和脯氨酸代谢)、脂代谢(鞘脂类代谢)、糖的合成与代谢(其他多糖降解等)($P < 0.05$)。

3 讨论

从肠道菌群的整体来看,无论是 Alpha 多样性、beta 多样性还是 OTU 韦恩比较图都直观且明显地表明了用双乙酸钠干预后,小鼠肠道菌群无论是菌群种类还是丰度均有显著提高,与对照组差异明显。双乙酸钠干预后,在门水平上,小鼠肠道菌群新增菌门仅占 0.54%,而原有菌门多样性与丰度也未显著减少,可见双乙酸钠对小鼠肠道菌群在门水平上的物种种类影响不大。但从门水平上的物种占比丰度来看除了蓝细菌门基本稳定外,其他 10 个菌门的变化幅度从 36.96% 至 252% 不等,因此,双乙酸钠对肠道菌群的物种占比丰度影响显著。在属水平上,双乙酸钠干预组的小鼠肠道菌群对比对照组,可测出菌属新增 447 种,而降至未测出的菌属有 142 种。因此,整体来看菌群种类增加明显。与此相对,占丰度比例较大的几种菌属如拟杆菌属、AKK 菌属等所占比例均有下降,幅度下降至对照组的 33.45% 至 0.17% 不等。而其中一些原先相对丰度较低的菌属经干预后发生不同程度的升高,最高可达对照组的 235 倍。由于丰度下降菌属占比较小,故菌群下降的丰度幅度显著低于升高的幅度。因此,双乙酸钠在属水平上对小鼠肠道菌群的组成种类和丰度均有显著影响,但从整体上增加了肠道菌群的多样性。

根据属水平中丰度比例变化较显著的 9 种菌来推测双乙酸钠可能存在的功能影响。有文献报道,拟杆菌属、AKK 菌属、颤螺旋菌属、瘤胃菌属的丰度比例变化都指向在实验剂量下双乙酸钠可能增加肥胖症的风险,与此推论相悖的脱硫弧菌

属的丰度升高比例低,也非优势菌群,相较而言增加肥胖症风险的可能更高^[12]。AKK 菌属、颤螺旋菌属、*Odoribacter*、*Dorea* 的丰度比例变化都指向在实验剂量下双乙酸钠可能增加炎症的风险^[12-15]。与此推论相悖的普氏菌属的丰度比例虽然升高了 2 倍,但其本身的丰度比例低,实际增幅不大^[16]。相较大幅变化的 AKK 菌等 4 种菌属而言,增加炎症风险的可能性更高^[11]。瘤胃菌属和 *Dorea* 的丰度比例变化都指向在实验剂量下双乙酸钠可能增加过敏的风险,前者提高了儿童过敏的风险,后者增加的是食物过敏的风险^[16]。

从 Picrust 代谢功能分析结果看,小鼠肠道菌群经双乙酸钠干预后,碳水化合物代谢、氨基酸代谢、脂代谢与核苷酸代谢等二级代谢功能随即下调,脂代谢下的脂肪酸合成上调,符合上文所述增加肥胖几率与炎症风险的推论,从菌群代谢功能预测方面加强了菌群分析的可信程度。

肠道菌群是一个复杂的多元体系,一种物质的干预会使得其内源的微生物群产生多方向的变化。这种变化不会是简单的是与否,而是多层次的,互相关联的。此消彼长、互相牵制的肠道菌群体系是肠道和身体健康稳态的关键。因此,可以推测,高剂量的双乙酸钠可能对肠道菌群的整体稳定性产生较大影响,从而可能引发肥胖、过敏或其他一些健康风险。

双乙酸钠增加了肠道菌群的多样性,同时肥胖几率与炎症风险也出现了上调,这与“菌群紊乱伴随着多样性减少”的固有印象和之前研究有所不符^[18]。但根据属水平的菌群变化分析可以看出,Alpha 多样性虽显著提高,但肠道菌群中的有益菌属丰度显著降低,部分有害菌属丰度显著升高($P < 0.05$)。菌群多样性的增加可能大多并非来源于有益菌,甚至部分来源于有害菌,破坏了肠道健康稳态,上调了炎症疾病和肥胖的风险。

综上所述,实验剂量下双乙酸钠干预的小鼠肠道菌群的多样性和丰度有显著变化,无论是整体上的菌群种类和物种丰度还是到门水平与属水平上的各个菌门与菌属,肠道菌群多样性和丰度的变化趋势显著提高。根据丰度比例变化最显著的有 9 种菌,如典型的拟杆菌属、AKK 菌属等,结合菌群代谢功能预测分析,在实验剂量下推测摄入双乙酸钠可能增加小鼠肥胖、过敏、慢性炎

症和肠胃炎的风险,相关机制有待进一步的研究与探讨。

参考文献:

- [1] Donia MS, Fischbach MA. Small molecules from the human microbiota[J]. *Science*, 2015, 349(6246): 1254-1266.
- [2] Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest[J]. *Nature*, 2006, 444(7122): 1027-1031.
- [3] Sonnenburg JL, Bäckhed F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism [J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 56-64.
- [4] Thaiss CA, Zmora N, Levy M, et al. The microbiome and innate immunity[J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 65-74.
- [5] Flint HJ, Scott KP, Louis P, et al. The role of the gut microbiota in nutrition and health[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2012, 9(10): 577-589.
- [6] Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, et al. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(3): 979-984.
- [7] Qin JJ, Li YR, Cai ZM, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes[J]. *Nature*, 2012, 490(7418): 55-60.
- [8] Mohammadzadeh-Aghdash H, Sohrabi Y, Mohammadi A, et al. Safety assessment of sodium acetate, sodium diacetate and potassium sorbate food additives[J]. *Food Chemistry*, 2018, 257: 211-215.
- [9] 李宏梁. 食品添加剂安全与应用[M]. 北京:化学工业出版社,2012:261.
- [10] 聂昌林,宋春阳. 双乙酸钠在畜禽生产中的应用[J]. *饲料广角*,2013,(2):45-46.
- [11] 王晓英,王宇光,刘颖,等. 新型防霉保鲜剂-双乙酸钠的生产与应用研究进展[J]. *乙醛醋酸化工*,2013,(2):9-13.
- [12] Kuczynski J, Lauber CL, Walters WA, et al. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2011, 13(1):47-58.
- [13] Shi Y, Tyson GW, DeLong EF. Metatranscriptomics reveals unique microbial small RNAs in the ocean's water column[J]. *Nature*, 2009, 459(7244): 266-269.
- [14] Michael CA, Mc Kenney PT, Pamer EG. *Clostridium difficile* colitis: pathogenesis and host defence[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016,14:609-620.
- [15] Gough E, Shaikh H, Manges AR. Systematic review of Intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent *Clostridium difficile* infection[J]. *Clinical Infectious Diseases An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2011, 53(10): 994-1002.
- [16] Pruesse E, Quast C, Knittel K, et al. SILVA: Comprehensive databases for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB [J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(21): 7188-7196.
- [17] Savage JH, Lee-Sarwar KA, Sordillo J, et al. A prospective microbiome-wide association study of food sensitization and food allergy in early childhood[J]. *Allergy*, 2017, 73(1): 145-152.
- [18] Alou MT, Lagier JC, Raoult D. Diet influence on the gut microbiota and dysbiosis related to nutritional disorders[J]. *Human Microbiome Journal*, 2016, 1: 3-11.

欢迎投稿

欢迎订阅