

不同油脂对小鼠肠道菌群的影响

朱航桦, 王锋, 杨贤, 王兆丹, 夏慧, 成晨, 孙桂菊

摘要:

[目的] 研究不同油脂对肠道菌群的影响。

[方法] 采用 C57BL/6 雄性小鼠(6 周龄, 体重 16~18 g), 每组 12 只, 分为 7 组, 对照组采用脂肪能量占总能量 10% 的普通饲料饲养, 其余 6 组用 D12451 高脂饲料进行饲养, 各组高脂饲料中的油脂分别为猪油、大豆油、24 度棕榈油、33 度棕榈油、混合油(含大豆油与棕榈油, 质量比=0.9:1)、橄榄油, 连续干预 12 周后眼眶采血, 检测总胆固醇和三酰甘油等血脂指标, 处死后采集结肠内的残留排泄物, 采用 16S rRNA 扩增子测序技术进行测序, 进行操作分类单元聚类 and 物种分类分析。采用 MetaStat 方法分析物种丰度数据, 得到 P 值, 校正后得到 q 值, 筛选具有差异的物种。

[结果] 实验组总胆固醇和三酰甘油高于对照组。混合油组放线菌门物种相对丰度高于对照组($q < 0.05$)。猪油组、33 度棕榈油组疣微菌门物种相对丰度高于对照组($q < 0.05$)。

[结论] 长期的高脂膳食会对小鼠肠道菌群产生影响。大豆油、橄榄油、24 度棕榈油不会引起肠道菌群的异常。

关键词: 油脂; C57BL/6; 肠道菌群; 血脂; 放线菌; 疣微菌; 16S rRNA

引用: 朱航桦, 王锋, 杨贤, 等. 不同油脂对小鼠肠道菌群的影响[J]. 环境与职业医学, 2017, 34(11): 995-998. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.17294

Effects of different oils on intestinal microbiota of mice ZHU Hang-ju, WANG Feng, YANG Xian, WANG Zhao-dan, XIA Hui, CHENG Chen, SUN Gui-ju (Department of Nutrition and Food Hygiene, Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210009, China). Address correspondence to SUN Gui-ju, E-mail: gjsun@seu.edu.cn • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract:

[Objective] To study the effects of different oils on intestinal microbiota.

[Methods] C57BL/6 male mice (6 weeks old, 16-18 g) were divided into 7 groups with 12 mice in each group. The control group was fed with an ordinary diet with a 10% fat-energy ratio, and the other groups were fed with a high-fat diet (D12451) added with lard, soybean oil, 24 degrees palm oil, 33 degrees palm oil, mixture oil (soybean oil and palm oil with a mass ratio of 0.9:1), and olive oil, respectively. After a 12-week diet intervention, blood samples were collected from the orbit of mice to detect total cholesterol and triglyceride. Residual waste was removed from colon to conduct 16S rRNA amplicon sequencing for cluster analysis and speciation analysis. MetaStat was used to analyze species abundance, obtain P value and q value (adjusted P value), and screen species with significant differences.

[Results] The total cholesterol and triglyceride of the experimental groups were higher than those of the control group. The mixed oil group showed a higher level of relative abundance of *Actinobacteria* than the control group ($q < 0.05$). The lard group and the 33 degrees palm oil group showed higher levels of relative abundance of *Verrucomicrobia* than the control group ($q < 0.05$).

[Conclusion] A long-term high-fat diet could affect the intestinal flora of mice. Soybean oil, olive oil, and 24 degrees palm oil do not cause abnormalities in intestinal microbiota.

Keywords: oil; C57BL/6; intestinal flora; blood fat; *Actinobacteria*; *Verrucomicrobia*; 16S rRNA

Citation: ZHU Hang-ju, WANG Feng, YANG Xian, et al. Effects of different oils on intestinal microbiota of mice[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2017, 34(11): 995-998. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.17294

• 作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

[基金项目] 江苏省普通高校研究生科研创新计划资助项目(编号: SJZZ15_0022); 国家重点研发计划(编号: 2016YFD0400604)

[作者简介] 朱航桦(1992—), 男, 硕士生; 研究方向: 营养与食品卫生; E-mail: 349390904@qq.com

[通信作者] 孙桂菊, E-mail: gjsun@seu.edu.cn

[作者单位] 东南大学营养与食品卫生学系, 江苏 南京 210009

大豆油是我国主要的食用油之一,富含多不饱和脂肪酸,单不饱和脂肪酸含量适中,饱和脂肪酸含量较低。近年来,棕榈油已经成为世界市场上的主要食用油。与大豆油、鱼油、橄榄油等相比,棕榈油的棕榈酸含量较高,其饱和脂肪酸含量高,单不饱和脂肪酸含量居中,而多不饱和脂肪酸亚油酸含量较低。橄榄油作为国外的常用油,现在已经引入中国。

大量研究显示,高脂饮食能够引起肠道组织发生氧化应激^[1]。脂肪消化的主要部位是小肠,可对肠道菌群产生直接的影响^[2]。健康人的胃肠道中寄居着多种多样的肠道菌群。这些肠道菌群间互相制约,互相依存,形成了动态平衡。长期高脂膳食摄入使机体内环境发生变化,部分肠道菌群被抑制,引起菌群失调,导致肠道菌群的正常动态平衡被打破,从而引起临床症状。有研究表明,高脂饮食可使大鼠肠道内乳酸和双歧杆菌数量明显降低^[3]。目前,关于各种油脂对肠道菌群的影响在国内外的研究较少。

16S rRNA^[4]位于原核细胞核糖体小亚基上,包括10个保守区域和9个高变区域,保守区在细菌间差异不大,高变区具有属或种的特异性,随亲缘关系不同而有一定的差异。因此,16S rRNA可以作为揭示生物物种的特征核酸序列,被认为是最适于细菌系统发育和分类鉴定的指标。目前,16S rRNA扩增子测序技术已成为研究环境样品中微生物群落组成结构的重要手段^[5-6]。根据所扩增的16S区域特点,基于IlluminaHiSeq测序平台,利用双末端测序的方法,构建小片段文库进行双末端测序。通过对读取片段Reads拼接过滤,操作分类单元(operational taxonomic units, OTU)聚类,并进行物种注释及丰度分析,可以揭示样品物种构成,进一步分析可以挖掘样品之间的差异。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

实验动物采用C57BL/6雄性小鼠(购自于南京市江宁区青龙山动物繁殖场)84只,6周龄,体重16~18g,小鼠饲养在东南大学公共卫生学院SPF动物房[实验动物使用许可证:SYXK(苏)2014-0007]。按照体重随机分为7组,每组12只,分别为猪油组、大豆油组、24度棕榈油组、33度棕榈油组、混合油组(含大豆油与棕榈油,质量比=0.9:1)、橄榄油组和对照组,单笼喂养。对照组采用脂肪占总能量10%的普通

饲料饲养,其余各组均采用D12451高脂饲料(脂肪占总能量45%)饲养,其中的油脂分别为猪油、大豆油、24度棕榈油、33度棕榈油、混合油、橄榄油,饲养12周。6种油脂的主要脂肪酸组成见表1,其中24度棕榈油的饱和脂肪酸含量低于33度棕榈油,不饱和脂肪酸高于33度棕榈油。饲料由江苏省协同生物工程有限责任公司加工完成,猪油、大豆油、24度棕榈油、33度棕榈油、橄榄油由益海嘉里丰益研发中心提供,猪油由江苏省协同生物工程有限责任公司提供。

表1 6种油脂的主要脂肪酸组成(%)

种类	饱和脂肪酸		不饱和脂肪酸	
	棕榈酸	硬脂酸	油酸	亚油酸
24度棕榈油	39.4	4.1	42.5	10.6
33度棕榈油	45.4	4.5	37.6	9.1
猪油	23.8	13.5	41.2	9.1
大豆油	10.2	3.8	22.8	51.0
混合油	25.5	3.9	33.1	29.7
橄榄油	13.0	3.9	76.3	4.6

1.2 仪器与试剂

Infinite M200 Pro多功能酶标仪(TECAN,瑞士),Centrifuge 5424 R离心机(Eppendorf,德国),总胆固醇、三酰甘油试剂盒(南京建成有限公司,中国),DNA提取试剂盒(Fast DNA Spin Kit for Feces, MP, 美国)。

1.3 血脂和肠道菌群检测

眼眶采血测三酰甘油、总胆固醇,处死后采集结肠内的残留排泄物,测定肠道菌群的组成。将结肠中的排泄物分离后放入离心管中,用DNA试剂盒提取DNA,PCR扩增纯化后,上机测序(由诺禾致源公司完成测序工作)。测序得到的原始数据进行拼接、过滤,得到有效数据。每组分别测3只C57BL/6小鼠肠道菌群的OTUs聚类和注释情况。依据OTUs聚类得到的结果,对每个OTU的代表序列作物种注释,由此得到对应的肠道菌群微生物物种信息和基于肠道菌群微生物物种的丰度分布情况。同时,对OTUs进行丰度、Alpha多样性计算等分析,可以得到肠道菌群内微生物的物种丰富度和均匀度信息、不同油脂组间的共有和特有OTUs信息等。进一步对OTUs进行多序列比对,得到不同油脂组间肠道群落结构差异,通过物种相对丰度累加图进行展示。

1.4 统计学分析

采用MetaStat(Version 2.15.3)统计分析方法对不同油脂组肠道菌群微生物物种的组成进行统计分析,

进一步比较不同油脂组间的群落结构差异。MetaStat 会根据样本情况自动调整统计方法(秩和检验或 Fisher 检验)。

2 结果

2.1 血脂指标

各组小鼠血清中总胆固醇和三酰甘油含量见表 2, 各实验组小鼠总胆固醇均高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.001$); 除橄榄油组外, 其他组小鼠的三酰甘油水平均高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.001$)。

表 2 不同油脂对小鼠血清总胆固醇和三酰甘油的影响
($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

组别	总胆固醇	三酰甘油
对照组	2.07 ± 0.38	0.52 ± 0.13
猪油组	$4.60 \pm 0.50^*$	$0.92 \pm 0.16^{**}$
33 度棕榈油组	$5.88 \pm 0.60^{**}$	$0.78 \pm 0.13^*$
24 度棕榈油组	$5.10 \pm 1.28^*$	$0.77 \pm 0.08^*$
大豆油组	$5.18 \pm 1.26^*$	$0.89 \pm 0.17^*$
混合油组	$5.08 \pm 0.97^*$	$0.89 \pm 0.19^*$
橄榄油组	$4.41 \pm 1.05^*$	0.58 ± 0.13

[注]*: 与对照组相比, $P < 0.001$; #: 与橄榄油组相比, $P < 0.05$ 。

2.2 物种相对丰度分析结果

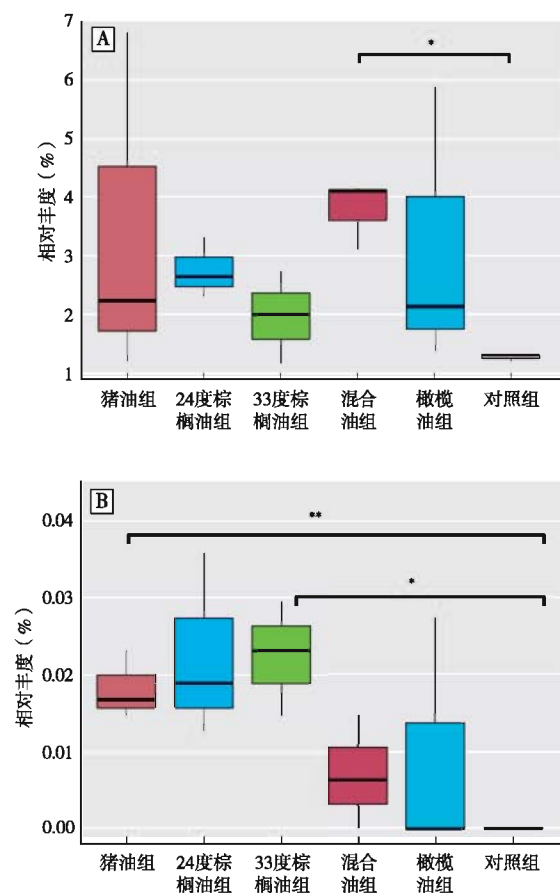
根据物种注释结果, 选取每个样品或分组在分类水平上最大丰度排名靠前的物种, 门水平各物种相对丰度结果见表 1。

表 1 各组别门水平肠道菌群相对丰度(%)

组别	猪油组	24 度棕榈油组	33 度棕榈油组	大豆油组	混合油组	橄榄油组	对照组
厚壁菌	55.507	46.599	53.856	53.393	52.190	52.119	49.607
拟杆菌	36.990	44.846	37.285	39.957	39.552	41.088	43.382
变形菌	3.691	4.437	6.490	4.615	3.929	3.195	2.918
放线菌	3.417	2.759	1.975	1.428	3.784	3.109	1.274
脱铁杆菌	0.062	0.535	0.053	0.095	0.252	0.185	1.361
软壁菌	0.215	0.619	0.070	0.109	0.164	0.195	1.166
蓝藻菌	0.032	0.099	0.134	0.064	0.018	0.013	0.112
螺旋原虫	0.004	0.016	0.006	0.001	0.011	0.011	0.088
其它	0.083	0.090	0.131	0.339	0.099	0.087	0.091

利用 MetaStat 方法对组间的物种丰度数据进行假设检验, 得到 P 值, 通过对 P 值的校正, 得到 q 值; 最后根据 q 值筛选出具有差异的物种, 并绘制差异物种在组间的丰度分布箱图, 发现仅有以下两门菌种分

布存在差异: 放线菌和疣微菌(见图 1)。混合油组放线菌门的物种丰度高于对照组($q < 0.05$)。猪油组、33 度棕榈油组疣微菌门的物种丰度均高于对照组($q < 0.05$)。



[注]A: 放线菌门; B: 疣微菌门。与对照组相比, *: $q < 0.05$; **: $q < 0.01$ 。—代表两个分组组间比较。

图 1 不同油脂处理组间肠道菌群物种丰富度比较

3 讨论

日常的高脂膳食会对人的肠道菌群产生影响, 甚至危及健康。越来越多的证据表明, 肠道菌群与肥胖、胰岛素抵抗、2 型糖尿病等疾病的易感性明显相关^[7]。有研究比较了肥胖小鼠和正常小鼠的肠道菌群基因, 发现两个实验组之间基因构成存在差异, 肥胖小鼠肠道内的微生物会富含更多可以参与能量代谢的基因, 导致机体更容易从食物中获取能量而发生肥胖^[8]。人类肠道菌群的组成中, 拟杆菌和厚壁菌为主要菌种, 放线菌、变形菌和疣微菌为次要菌种^[9]。在本次实验中, 疣微菌和放线菌是受油脂差异影响的两种菌。

目前高脂膳食对肠道菌群影响的研究结果并不一致, Zhang 等^[10]用脂肪能量占总能量 60% 的高脂膳

食干预后,高脂组的厚壁菌、疣微菌、乳球菌相比对照组有所升高,变形菌门有所下降。Lam等^[11]用脂肪能量占总能量60%的高脂膳食干预后,高脂组的厚壁菌门水平相比对照组有所升高,拟杆菌门有所下降。在de Wit等^[12]的研究中,同样采用D12451的高脂膳食配方,实验组采用了3种不同油脂(分别为棕榈油、橄榄油和红花油),经过8周的高脂膳食干预,橄榄油组和红花油组与对照组的肠道菌群没有差异,棕榈油的高脂膳食干预引起肠道菌群的异常,de Wit推测饱和脂肪酸是影响肠道菌群稳态的因素。本实验中引起疣微菌群异常变化的猪油组和33度棕榈油组中饱和脂肪酸硬脂酸的含量是对照组的3倍以上,硬脂酸可能是油脂中引起疣微菌群异常的关键因素,长期的高饱和脂肪膳食会对肠道菌群产生影响^[1],不断影响肠道菌群组成多样性和功能,导致共生关系失调,最终导致疾病易感性增加和疾病的发生发展^[3]。相比其他几种油脂,本实验中比例相对适中的混合油(含大豆油与棕榈油,质量比=0.9:1)组中各项指标基本没有差异,但是在肠道菌群中引起了放线菌的异常,二者是否存在确定关系仍有待于更多实验验证,硬脂酸影响疣微菌群的机制也有待进一步研究。

参考文献

- [1] 乔艺.高脂诱导的氧化应激对小鼠肠道菌群改变与炎症反应的影响[D].无锡:江南大学,2014.
- [2] 侯淑玲,黄兴国.高脂饮食对肠道菌群结构的影响[J].湖南饲料,2017(1): 35-38.
- [3] 徐仁应,万燕萍,方启宇,等.高脂饮食对大鼠肠道益生菌和肝脂肪含量的影响[J].营养学报,2011,33(4): 367-369, 375.
- [4] 米秀娟,李光勤.丹红注射液对局灶性脑缺血大鼠神经功能恢复的影响及其机制的研究[J].中国全科医学,2010,13(8): 870-873.
- [5] Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(S1): 4516-4522.
- [6] Youssef N, Sheik CS, Krumholz LR, et al. Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(16): 5227-5236.
- [7] Miele L, Marrone G, Lauritano C, et al. Gut-liver axis and microbiota in NAFLD: insight pathophysiology for novel therapeutic target [J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(29): 5314-5324.
- [8] 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.
- [9] 黄秀艳,曾耀英.肠道微生物群的病理生理学进展[J].中国病理生理杂志,2014,30(6): 1127-1135.
- [10] Zhang C, Zhang M, Pang X, et al. Structural resilience of the gut microbiota in adult mice under high-fat dietary perturbations [J]. ISME J, 2012, 6(10): 1848-1857.
- [11] Lam YY, Ha CW, Campbell CR, et al. Increased gut permeability and microbiota change associate with mesenteric fat inflammation and metabolic dysfunction in diet-induced obese mice [J]. PLoS One, 2012, 7(3): e34233.
- [12] de Wit N, Derrien M, Bosch-Vermeulen H, et al. Saturated fat stimulates obesity and hepatic steatosis and affects gut microbiota composition by an enhanced overflow of dietary fat to the distal intestine [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012, 303(5): G589-G599.

(收稿日期:2017-04-13;录用日期:2017-09-30)

(英文编辑:汪源;编辑:陈姣;校对:丁瑾瑜)