



三种不同海洋脂质对溃疡性结肠炎小鼠及其肠道菌群的影响

朱凯¹, 戴志远^{1,2,3}, 沈清^{1,2,3}, 郑振霄^{1,2,3*}

(1. 浙江工商大学海洋食品研究院, 浙江 杭州 310012;

2. 浙江省水产品加工技术研究联合重点实验室, 浙江 杭州 310012;

3. 浙江工商大学, 海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心, 浙江 杭州 310012)

摘要: 为了研究 3 种不同海洋脂质——二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid, EPA)、二十二碳五烯酸 (docosapentaenoic acid, DPA) 和二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA) 对溃疡性结肠炎 (UC) 小鼠及其肠道菌群的影响, 本实验采用葡聚硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 诱导的 C57BL/6 小鼠为 UC 模型, 以小鼠的体质量减少量、疾病活动指数、结肠表观、结肠长度、结肠的重量与长度比、苏木精-伊红染色结肠组织切片的显微观察及组织学损伤评分为指标评价 3 种海洋脂质对 UC 小鼠的干预效果, 采用 16S *rDNA* 高通量测序的方法研究了 3 种海洋脂质对小鼠肠道微生态的影响。结果显示, 3 种海洋脂质均可以有效抑制 UC 小鼠体质量的下降、疾病活动指数的升高、结肠长度的缩短及组织损伤评分的升高, 其中 DPA 在抑制体质量下降、疾病活动指数升高以及组织损伤评分升高方面的干预效果显著优于其他二者。16S *rDNA* 高通量测序的结果显示, 3 种海洋脂质可以有效抑制 UC 小鼠肠道内拟杆菌属、脱硫弧菌属、肠球菌属、埃希菌属/志贺氏菌属、乳球菌属、普雷沃菌属和毛螺旋菌属丰度的增加, 阿克曼氏菌属、理研菌属、双歧杆菌属、布劳特氏菌属、丁酸杆菌属、真杆菌属和颤螺旋菌属丰度的降低, 其中 DPA 对阿克曼氏菌属、理研菌属、丁酸杆菌属和埃希菌属/志贺氏菌属具有更加显著的调控作用。本研究表明, EPA、DPA 和 DHA 这 3 种海洋脂质可以显著缓解 UC 小鼠的病症, 并且可以显著改变 UC 小鼠肠道菌群的结构和组成, 说明这 3 种海洋脂质对 UC 的管控作用或与其对肠道特定微生物的调控作用相关。本研究为海洋脂质, 尤其是 DPA 的生物学效应研究提供了参考, 并为膳食管控慢性疾病提供借鉴。

关键词: 海洋脂质; 溃疡性结肠炎; 16S *rDNA* 测序; 肠道微生物

中图分类号: S 963.73

文献标志码: A

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种以腹泻、腹痛和出血为主要临床症状的非特异性慢性肠道疾病。长久以来, 由于饮食习惯原因, UC 在西方发达地区的发病率较高, 以北欧 UC 的发病率最高, 约为 57.9/10 万人, 北美次之,

约为 23.14/10 万人^[1-2]。虽然 UC 在我国的发病率低于北欧和北美, 但数据显示, 我国 UC 的发病率呈逐年上升趋势, 尤其是进入 21 世纪以来, 西式膳食对我国居民的传统饮食习惯产生了巨大影响, 我国 UC 的发病人群呈快速增加趋势,

收稿日期: 2021-04-15 修回日期: 2021-06-05

资助项目: 国家重点研发计划 (2018YFC0311204)

第一作者: 朱凯 (照片), 从事水产功能食品研究, E-mail: 1090147729@qq.com

通信作者: 郑振霄, E-mail: zheng_zhen_xiao@163.com



预计到2025年,中国UC的人数或达到150万例,成为常见疾病^[3-4]。由于UC病程长、易复发,且发病群体主要为青壮年,不仅严重影响了社会生产力,还给整个社会带来了巨大的经济负担。因此,UC也被世界卫生组织列为“现代难治病”。目前,常用于控制UC的药物主要有氨基水杨酸类、糖皮质激素类、免疫抑制剂等。这些药物虽可以一定程度上缓解UC的症状,但长期服用所带来的副作用和耐药性令患者痛苦不堪^[5]。

鉴于膳食结构是促使UC发生和发展的重要原因,采取膳食干预对UC进行管控成为当下的研究热点^[6-7]。海洋脂质泛指从海洋生物中分离得到的脂类的总称,其中n-3多不饱和脂肪酸(n-3 polyunsaturated fatty acid, n-3 PUFA)是海洋脂质中的重要成员。有研究证实,高n-3PUFA饮食结构的人群患UC的风险明显低于n-3 PUFA摄取不足的人群,此外,提高患者膳食中n-3 PUFA的比重亦可以有效缓解患者体内的炎症反应,改善其临床症状,表明n-3PUFA对UC的发生和发展具有抑制作用^[8-11]。关于其发挥功效的机制,目前尚未完全确定,新的研究表明,其可调控肠道菌群,从而发挥功能^[12]。然而多数实验是以n-3 PUFA混合物为研究对象展开的,系统地比较EPA、DPA和DHA对UC及肠道菌群影响的研究较为少见。本实验以葡聚硫酸钠(dextran sulphatesodium, DSS)诱导的C57BL/6小鼠为UC模型,采用EPA、DPA和DHA对其进行干预,以小鼠的体质量损失及疾病活动指数(disease activity index, DAI)、结肠表观及长度、结肠组织切片的病理评分为指标,评价了3种海洋脂质对UC的干预效果,采用16S rDNA高通量测序的方法研究3种海洋脂质对UC小鼠肠道菌群的影响,以期从肠道微生态的角度解释3种海洋脂质干

预UC的作用机制,拓展膳食脂肪酸(尤其是DPA)的生物学效应,并为膳食管控UC等慢性疾病提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与实验分组

硫酸葡聚糖(dextran sulphatesodium, mw 36000-50000,美国MP公司);粪便隐血定性检测试剂盒购自北京雷根生物技术有限公司;4%多聚甲醛通用型组织固定液购自北京索莱宝科技有限公司;EPA、DPA和DHA乙酯由本实验室自制(纯度>97%);基础饲料购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,按质量比10%在基础饲料的基础上制作富含EPA、DPA和DHA的合成饲料;雄性C57BL/6小鼠(*Mus musculus*)(8周龄,30只,每组6只)购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,小鼠饲养在标准条件下[(22±3)°C,湿度50%±5%和12h光/暗循环],小鼠驯化1周后开始实验。本研究所有动物实验程序均经相关实验动物伦理委员会批准。实验周期为8周,其中前7周为干预期,第8周为造模期。具体的分组方案如表1所示。

1.2 实验方法

体质量及DAI评分 造模期间每日监测各组小鼠体质量变化率(0~4分)、粪便黏稠度(0~4分)、粪便隐血(0~4分)并评分,评分标准参考Murano等^[13]的方法。其中,粪便隐血的测定采用粪便隐血定性检测试剂盒(TC0511,北京瑞安生物科技有限公司),根据试剂盒说明书进行测定。DAI的分值为上述3者的平均分。

结肠表观及长度 实验结束后处死小鼠。对小鼠进行解剖以获得结肠组织(从盲肠末端到

表1 分组与给药方案

Tab. 1 Grouping and administration scheme

分组 grouping	干预期 intervention period	造模期 modeling period
EPA组 EPA group	10% EPA的合成饲料+纯净水	10% EPA的合成饲料+3%DSS水溶液
DPA组 DPA group	10% DPA的合成饲料+纯净水	10% DPA的合成饲料+3%DSS水溶液
DHA组 DPA group	10% DHA的合成饲料+纯净水	10% DHA的合成饲料+3%DSS水溶液
模型组 model group	基础饲料+纯净水	基础饲料+3% DSS水溶液
健康组 healthy group	基础饲料+纯净水	基础饲料+纯净水

肛门)。观察结肠组织是否出现溃疡、糜烂、充血、水肿等症状。随后将经新洁尔灭浸泡消毒的结肠组织置于超净工作台上测量长度。取出结肠内的粪便,测量结肠重量。

结肠组织损伤分析 新鲜结肠组织用4%多聚甲醛固定24 h,脱水、打蜡、包埋、切片后室温保存。结肠组织用不同浓度的二甲苯和乙醇处理,再经脱蜡洗涤、苏木精-伊红(H.E)染色、脱水密封后显微镜下观察。根据 Millar 等^[14]描述的标准进行组织损伤评分。

DNA 提取、PCR 扩增及 16S *rDNA* 测序

实验结束时,处死小鼠,解剖结肠。新鲜的粪便用液氮处理并在研钵中粉碎。利用粪便基因组 DNA 提取试剂盒 [DP328, 天根生化科技(北京)有限公司] 提取微生物基因组 DNA。采用上游引物(5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3')和下游引物(5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')对微生物基因组的 V3~V4 可变区进行扩增。PCR 反应体系(25 μ L): PhusionHot start flex 2X Master Mix 12.5 μ L, 上下游引物各 2.5 μ L, 模板 DNA 50 ng, 加超纯水至 25 μ L。PCR 反应程序: 98 $^{\circ}$ C 30 s; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 54 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,回收目标片段,使用 Beckman AMPure XP 磁珠纯化核酸,并用 Qubit[®] 荧光计 (Invitrogen, 美国) 定量。使用安捷伦 2100 生物分析仪(美国安捷伦公司)制备和评估扩增子库,并使用 Illumina 的库量化试剂盒(Kapa Biosciences, 美国)进行定量。扩增子库由联川生物技术在 Illumina NovaSeq PE250 平台上,根据标准步骤,进行双端测序(2 \times 250)。

生物信息学分析 采用 FLASH(V1.2.11) 软件,根据双端测序结果的重叠关系进行序列拼接,去除序列中的 barcode 和引物序列。采用 Vsearch(V2.3.4) 软件过滤嵌合体,获得高质量的干净标签(clean data),将序列相似性大于 97% 的标签定义为一个操作分类单元(OTU),挑选最佳的 OTU 代表序列,用基于 NCBI-16S 数据库的 RDP(核糖体数据库)分类器(V2.2)对每一 OTU 代表序列进行物种注释。 α 多样性指数(Chao1 和 Simpson 指数)以及微生物组成分析均采用 QIIME(V1.9.0, <http://www.r-project.org/>) 软件包进行。用 R 软件(<http://www.r-project.org/>) 进行主成

分分析(PCA),并对每组前 30 个优势菌属进行分析。

1.3 数据分析

用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析。用 SPSS 19.0 软件对实验数据进行单因素方差分析,用 Duncan 氏多重检验进行均值分离($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 体质量及 DAI 评分

体质量的变化能直观地反映小鼠的健康状况,是判断疾病发展的重要指标^[15]。DSS 处理期间小鼠体质量的变化量:健康组小鼠体质量相对稳定,略有增加,由 100% 增加到 103.11%。其他 4 组出现不同程度的体质量减轻。模型组第 3 天后体质量迅速下降,由 95.52% 降至 81.15%。EPA 组、DPA 组和 DHA 组第 4 天后体质量迅速下降,分别由 93.55% 下降到 86.78%、95.12% 下降到 90.90%、94.39% 下降到 89.59% (图 1-a)。UC 的病理表现复杂,仅凭体质量变化不能全面反映疾病的发展。DAI 综合了体质量变化、便血、粪便性状等指标,并进行综合量化,广泛应用于 UC 的临床诊断^[16]。健康组在 DSS 处理期间 DAI 评分保持在 0。其他 4 组在第 3 天后迅速增加,EPA、DPA、DHA 和模型组的 DAI 评分分别为从 0.33 增加到 3.33、0.33 增加到 2.67、0 增加到 3.00 和 0.33 增加到 4.00 (图 1-b)。根据体质量和 DAI 评分结果,EPA、DPA 和 DHA 的干预能有效地抑制体质量下降和 DAI 上升的趋势,且 DPA 的抑制作用强于其他二者。

2.2 结肠外观、长度、重量/长度及组织学分析

健康组结肠状况良好,无溃疡、糜烂、充血、水肿等症状,结肠长度较长,为 7.78 cm,质量(mg)与长度(cm)的比值为 34.11 mg/cm。模型组小鼠的结肠出现了明显的肠腔水肿、充血,结肠外膜变脆,说明结肠损伤严重,同时结肠组织的长度也出现了明显缩短,为 5.16 cm,质量与长度的比值上升到 51.50 mg/cm。EPA、DPA 和 DHA 组小鼠结肠组织的长度分别为 6.25、6.29 和 6.31 cm,分别比模型组增加了 21.12%、21.90% 和 22.29%,质量与长度的比值分别为 42.15、42.16

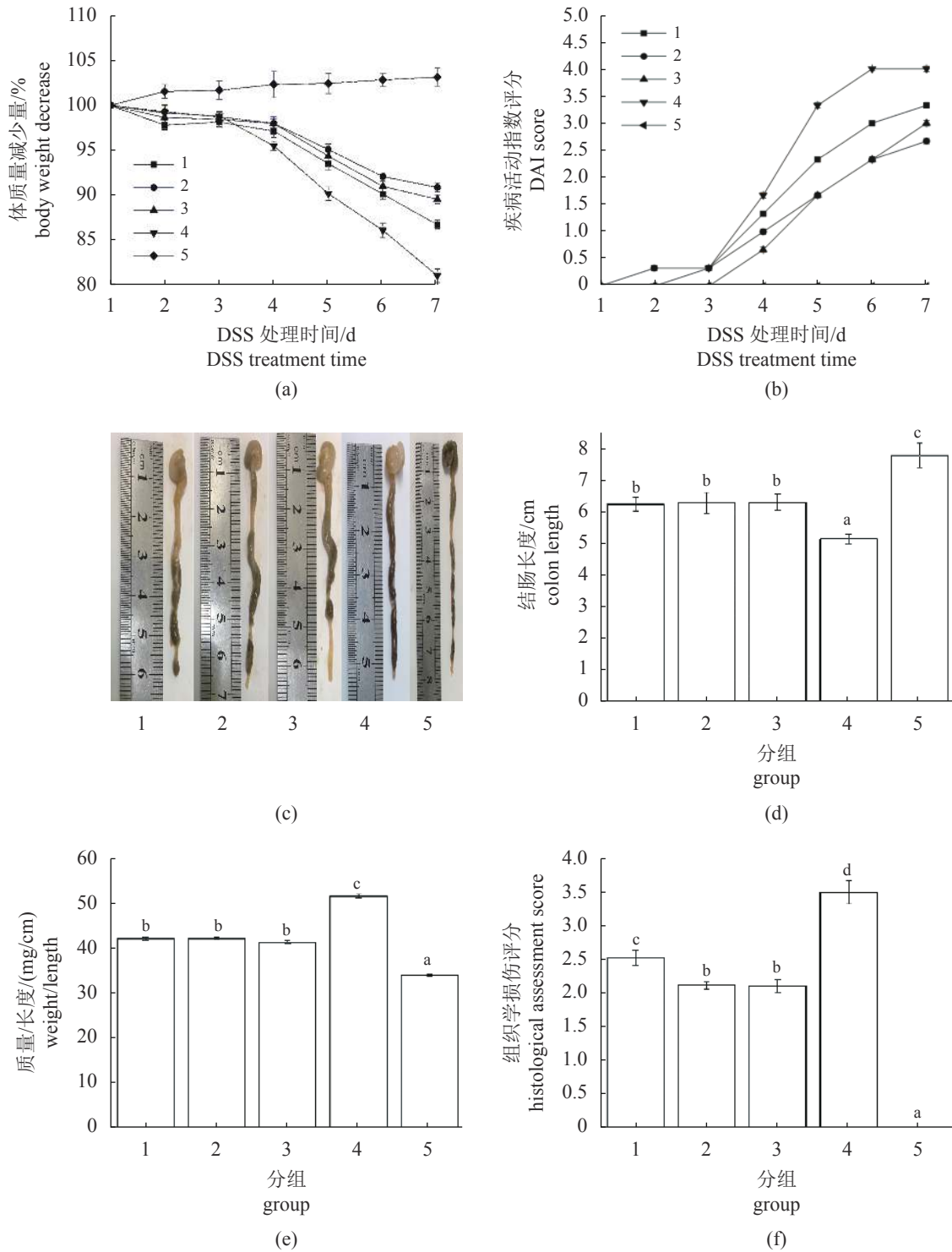


图 1 3种海洋脂质干预缓解溃疡性结肠炎小鼠症状

(a) 体质量减少量; (b) 疾病活动指数; (c) 结肠外观; (d) 结肠长度; (e) 结肠质量/长度; (f) 组织学损伤评分; 1,2,3,4,5 分别代表 EPA 组、DPA 组、DHA 组、模型组和健康组; 不同字母代表显著性差异 ($P < 0.05$); 下同

Fig. 1 Supplementation of 3 kinds of marine lipids ameliorated the symptoms of UC mice

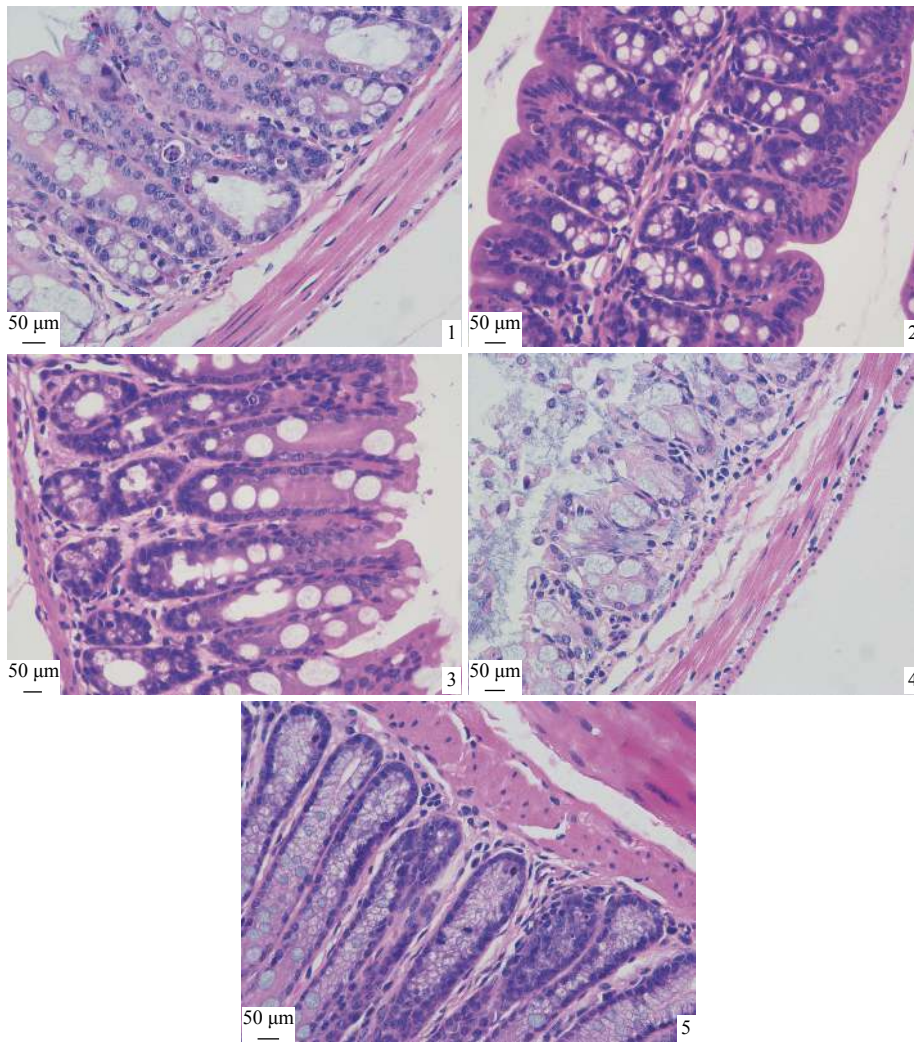
(a) the loss of weight; (b) DAI score; (c) representative macroscopic images of the colon; (d) colon length; (e) the ratio of colon weight/length; (f) histological score; 1,2,3,4,5 represent EPA group, DPA group, DHA group, model group and healthy group; different letters represent significant differences ($P < 0.05$); the same below

和 41.35 mg/cm, 分别比模型组降低了 22.18%, 22.15% 和 24.55%(图 1-c~e)。这说明 EPA、DPA 和 DHA 可以显著缓解 DSS 对小鼠带来的结肠组织的缩短以及水肿。健康组结肠上皮结构完整, 绒毛结构排列紧密整齐, 杯状细胞丰富, 隐窝排列整齐, 腺体结构完整, 未见炎性细胞浸润, 组织学评分为 0。然而, 在模型组中出现了明显单核细胞及中性粒细胞灶性浸润, 肠绒毛广泛坏死脱落, 隐窝大范围损坏, 组织学评分为 3.51 分。EPA、DPA 和 DHA 处理后, 这些损伤得到明显改善, 3 组的组织学评分为 2.51、2.16 和 2.23 (图 1-f, 图版)。以上数据分析发现, DPA 和 DHA 似乎发挥了较强的保护作用, 而 EPA 的保

护作用稍弱。

2.3 肠道微生态分析

多样性分析 Coverage 值反映样本的覆盖率, 值越大, 检测到样本中序列的概率越高, 这可以更好地表示样本的自身情况^[17]。5 组样本的覆盖值接近 1, 说明测序结果能够反映样本的真实情况。与健康组对比, 模型组 ACE、Shannon、Chao1 指数显著降低 ($P<0.05$), 说明 DSS 处理破坏了小鼠结肠内微生物群落的丰富度和多样性, 这种状况在 EPA、DPA 和 DHA 组中有所改善 (表 2)。根据样品中 OTU 的分布, 制作 5 组共有和特有的 OTU 的韦恩图 (图 2-a)。其中 5 组共有的 OTU 有 68 个, 健康组特有的 OTU 最多,



图版 小鼠结肠组织的 H.E 切片 (400×)

1~5 分别代表 EPA 组、DPA 组、DHA 组、模型组和健康组

Plate Images of colonic sections stained with H.E (400×)

1-5 represent EPA group, DPA group, DHA group, model group and healthy group

为430个，模型组特有的OTU最少，为199个，EPA、DPA和DHA组特有的OTU分别为309、361和222个。采用主成分分析对不同组别微生物群落结构的相似性进行分析，从X、Y主成分轴上看，主成分对样品成分差异的解释度为77.42%，说明这2个主成分可以较准确地反映样品的相似关系。模型组与健康组的距离最远，说明DSS诱导严重扰乱了小鼠肠道菌群的组成结构，二者微生物组成差异较大。EPA、DPA和DHA组的采样点分布集中，处于模型组和健康组之间，且DPA组与健康组采样点距离较近，说明EPA、DPA和DHA干预可以使受到扰乱的肠道菌群趋于正常，且DPA组更接近健康组(图2-b)。

门水平各组菌群丰度比较 门水平菌群组成分析结果显示，各组菌落的成分相似，但比例悬殊，其中优势菌门为厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)和脱铁杆菌门(Deferribacteres)。其他重要的菌门有软壁菌门(Tenericutes)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)和疣微菌门(Verrucomicrobia)等(图3)。厚壁菌门可通过促进抗炎介质的分泌来调节炎症反应。此外，厚壁菌门和拟杆菌门的比例与炎症程度正相关^[18-19]。健康组中厚壁菌门和拟杆菌门的相对丰度分别为51.75%和40.16%，且二者之比(F/B)为1.29。模型组厚壁菌门和拟杆菌门的相

表2 样品微生物组成的α多样性分析

Tab. 2 Alpha diversity of samples for all groups

	ACE指数 ACE index	Shannon指数 Shannon index	Simpson指数 Simpson index	Chao1指数 Chao1 index	覆盖率 coverage rate
EPA组	570.15±25.41 ^c	6.23±0.15 ^c	0.85±0.02 ^a	573.39±21.25 ^c	0.9968±0.0010 ^a
DPA组	615.31±31.64 ^d	6.95±0.21 ^d	0.86±0.01 ^a	613.88±22.35 ^d	0.9925±0.0021 ^a
DHA组	484.26±18.26 ^b	5.93±0.11 ^b	0.86±0.03 ^a	486.00±19.58 ^b	0.9915±0.0011 ^a
模型组	425.10±20.35 ^a	4.53±0.25 ^a	0.90±0.02 ^c	431.38±23.14 ^a	0.9975±0.0013 ^a
健康组	628.75±25.67 ^e	7.15±0.16 ^e	0.88±0.01 ^b	631.05±25.44 ^e	0.9924±0.0027 ^a

注：同列不同字母表示显著性差异；下同

Notes: different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) among different groups; the same below

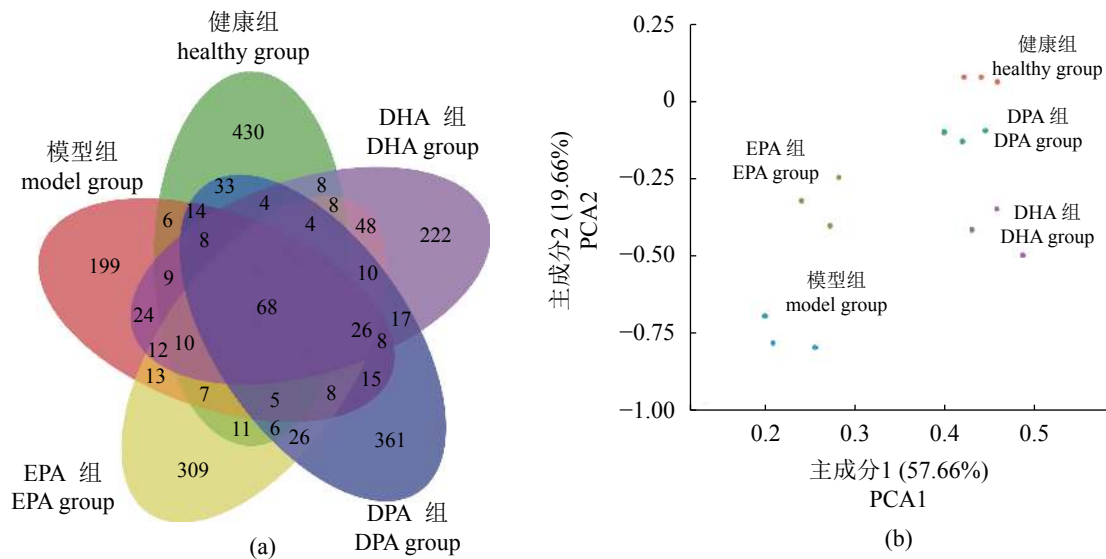


图2 样品组间差异分析

(a) 韦恩图; (b) 主成分分析图

Fig. 2 Analysis of the difference between sample groups

(a) Venn diagram; (b) PCA analysis

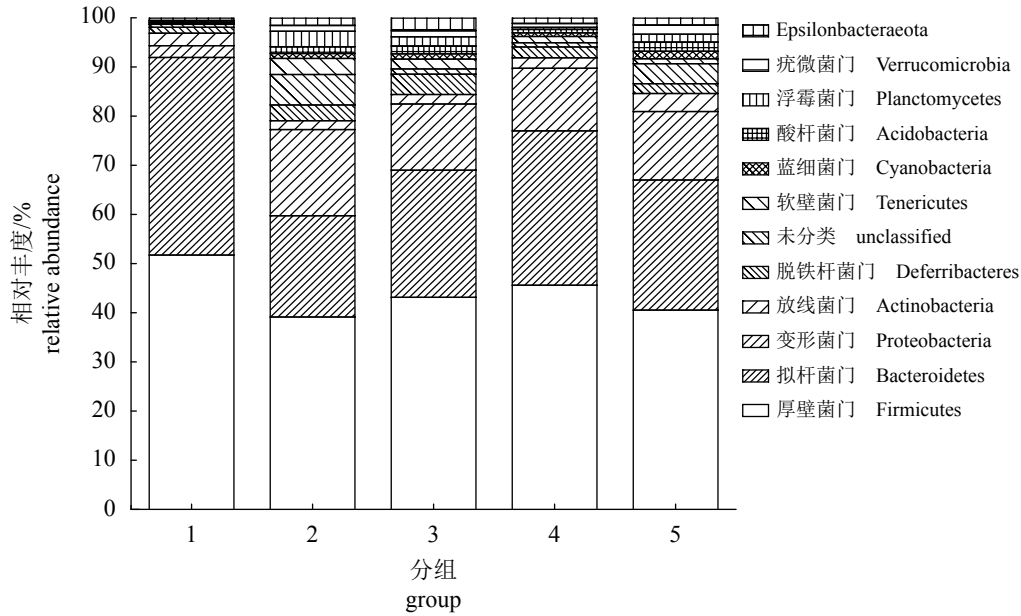


图3 门水平分析肠道菌群的丰度

Fig. 3 Relative abundance of gut microbiota at the phylum level

对丰度出现下降 (分别为 39.15%和 20.57%), 但是 F/B 上升至 1.90。EPA、DPA 和 DHA 组中, 厚壁菌门和拟杆菌门的丰度下降及 F/B 比值升高的趋势均被抑制。变形菌门是细菌中最大的门之一, 其中包含了许多病原菌, 如大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、沙门氏菌 (*Salmonella*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 和幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)。这些细菌通常能破坏肠道通透性, 加剧 UC 的发展。与此相反的, 放线菌门是一个包含许多益生菌的菌门。这些细菌能调节机体的免疫应答, 因此具备增强机体先天免疫的功能^[20]。健康小鼠中, 变形菌门的相对丰度为 2.39%, 而这一数值在模型组中增加到了 17.58%。EPA、DPA 和 DHA 的干预抑制了这一增长趋势, 放线菌门的相对丰度呈现相反的趋势。总之, DSS 处理造成了小鼠肠道菌群的紊乱, 而 EPA、DPA 和 DHA 的干预缓解了这种状况。

属水平各组菌群丰度比较 与健康组相比, 模型组菌群组成出现显著变化, 其中相对丰度出现增加的主要菌属有别杆菌属 (*Allobaculum*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、埃希菌属/志贺氏菌属 (*Escherichia/Shigella*)、乳球菌属 (*Lactococcus*)、普雷沃菌属 (*Prevotella*) 和毛螺菌属 (*Lachnospiraceae*), 丰度出现下降的主要菌属包括阿克曼氏菌属、理研菌属 (*Rikenella*)、双歧

杆菌属、布劳特氏菌属、丁酸杆菌属、真杆菌属和颤螺旋菌属 (表 3)。综上所述, EPA、DPA 和 DHA 的干预抑制了益生菌丰度的降低和有害细菌丰度的增加。此外, DPA 对阿克曼氏菌属、理研菌属、别杆菌属、丁酸杆菌属和埃希菌属/志贺氏菌属的丰度具备更有效的调节作用。

3 讨论

溃疡性结肠炎作为现代社会的一种难治之症, 具有疗程长、易复发的特点。药物的副作用使人们把注意力转向饮食干预。实验通过体质量减少量、DAI 评分、结肠长度、结肠重量/长度和组织损伤评分, 评价了 EPA、DPA 和 DHA 这 3 种海洋脂质对 UC 小鼠的保护作用, 并采用 16S *rDNA* 测序的方法研究了 3 种脂质对 UC 小鼠肠道菌群组成和结构的影响, 旨在从肠道微生态的角度解释 3 种海洋脂质干预 UC 的作用机理, 以期为膳食管控慢性疾病提供参考。

体质量减少、便血和稀便是溃疡性结肠炎的典型症状。由于肠道是人体营养吸收的主要部位, UC 患者伴随严重的肠黏膜充血水肿, 导致肠道无法正常吸收营养物质。由于 UC 难以根治, 反复发作, 导致患者情绪低落, 造成食欲下降。此外, UC 患者肠道内严重的炎症反应会导致肠黏膜充血水肿, 敏感性增加, 增加了胃

表 3 属水平分析肠道菌群的丰度

Tab. 3 Relative abundance of gut microbiota at the genus level

名称 name	健康组 healthy group	模型组 model group	EPA组 EPA group	DPA组 DPA group	DHA组 DHA group
阿克曼氏菌属 <i>Akkermansia</i>	5.51	4.75	10.59	16.15	12.21
理研菌属 <i>Rikenella</i>	4.62	1.32	5.16	7.97	3.12
别杆菌属 <i>Allobaculum</i>	1.78	15.74	7.56	2.35	4.12
拟杆菌属 <i>Bacteroides</i>	2.75	7.12	6.25	5.16	6.49
双歧杆菌属 <i>Bifidobacterium</i>	5.26	0.25	3.25	4.45	2.16
布劳特氏菌属 <i>Blautia</i>	5.56	1.06	3.61	3.82	3.16
丁酸杆菌属 <i>Butyricoccus</i>	3.25	0.24	2.18	6.27	3.15
脱硫弧菌属 <i>Desulfovibrio</i>	2.11	7.45	3.15	4.46	4.82
肠球菌属 <i>Enterococcus</i>	1.05	3.25	1.28	0.75	0.99
埃希菌属/志贺氏菌属 <i>Esherichia/Shigella</i>	2.05	10.15	5.25	3.15	6.24
真杆菌属 <i>Eubacterium</i>	1.36	1.19	1.25	1.41	1.25
<i>Faecalibacterium</i>	1.62	1.32	1.12	1.97	3.11
乳杆菌属 <i>Lactobacillus</i>	18.45	10.45	20.23	14.48	21.16
乳球菌属 <i>Lactococcus</i>	0.15	5.28	2.15	2.58	2.11
<i>Mucispirillus</i>	2.67	1.93	0.44	1.02	1.02
颤螺旋菌属 <i>Oscillibacter</i>	2.86	0.27	1.31	2.15	2.17
副拟杆菌属 <i>Parabacteroides</i>	1.25	1.26	3.45	3.24	4.24
普雷沃菌属 <i>Prevotella</i>	1.25	3.15	1.12	0.56	0.84
罗氏菌属 <i>Roseburia</i>	1.28	1.36	0.41	0.16	0.32
毛螺旋菌属 <i>Lachnospiraceae</i>	2.56	4.85	3.15	3.25	1.56
瘤胃梭菌属_5 <i>Ruminiclostridium_5</i>	0.99	0.73	0.18	2.52	0.40
消化球菌属 <i>Peptococcaceae_unclassified</i>	2.30	0.29	0.88	1.07	0.24
瘤胃梭菌属_9 <i>Ruminiclostridium_9</i>	3.37	1.19	0.34	1.06	0.51
醋酸菌属 <i>Acetatifactor</i>	2.74	0.38	0.43	0.11	0.45
伯克氏菌属 <i>Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	2.29	0.27	2.67	0.15	0.72
丝状菌属 <i>Kineothrix</i>	1.32	0.36	0.49	0.25	0.31
<i>Lachnoclostridium</i>	0.56	0.06	0.61	0.08	0.16
<i>Intestinimonas</i>	2.67	1.93	0.44	1.02	1.02
<i>Firmicutes_unclassified</i>	1.19	1.18	1.41	1.53	1.89
<i>Anaerotignum</i>	2.41	0.41	0.11	2.15	1.72
其他 others	12.77	10.81	9.53	4.71	8.34

肠动力性蠕动，导致肠胃对血液水分的吸收减弱，引起腹泻，同时引起菌群失调、机会性感染等，严重时还会导致出血^[21-22]。在本实验中

DSS 处理组小鼠出现了明显的体质量减少、便血和稀便症状，这说明模型建立成功，而在 EPA、DPA 和 DHA 组中，这些症状都得以缓解，3 个

实验组的 DAI 评分分别降低了 16.75%、33.25% 和 25.00%，由此可以看出 3 种海洋脂质均可以缓解小鼠 DAI 评分的升高，且 DPA 的干预效果似乎要好于其他二者，类似的结果在组织损伤评分的结果中也可以得出。

海洋脂质干预 UC 的机制尚未完全确定，但新的研究表明，海洋脂质对肠道微生物的调控作用是其发挥功效的重要方面^[23]。Menni 等^[24]对 876 名女性志愿者血清中海洋脂质 n-3 PUFA 的水平、肠道菌群的多样性及丰度进行检测，发现 n-3 PUFAs 的摄入量与肠道益生菌的多样性和丰度关联密切，且 n-3 PUFAs 摄入量高的人群中肠道疾病的发病率远低于 n-3 PUFAs 摄入不足的人群。Miyamoto 等^[25]的研究表明，n-3 PUFAs 在肠道中可以被某些细菌利用，并产生积极的代谢产物，这些代谢产物具有抗炎、清除有害菌的作用，反过来又会影响肠道菌群的结构，抵消肠道菌群的紊乱。本实验在海洋脂质缓解 UC 症状的基础上，采用高通量测序的方法研究了 3 种海洋脂质对小鼠肠道微生态的影响。健康小鼠肠道内的微生物组成和结构通常较为稳定，组成较丰富且多样性较高，表征微生物丰富性的 Chao1 指数和 ACE 指数分别为 631.05 和 628.75，表征微生物多样性的 Shannon 指数和 Simpson 指数分别为 7.15 和 0.88。DSS 处理严重破坏了小鼠肠道内微生物的丰富性和多样性，模型组的 Chao1 指数和 ACE 指数分别下降到了 431.38 和 524.10，Shannon 指数也下降到了 4.53，这种破坏作用在 3 种海洋脂质处理组中均得到了一定程度的缓解。根据样品中 OTU 的信息，采用 PCA 的方法对 5 组样品进行 β 多样性分析，每个样品的代表取样点均较为集中，说明样品的重复性较好，各个样品的代表取样点较为分散，说明 5 组样品间微生物的组成差异显著。健康组和模型组之间的距离最远，3 种海洋脂质处理组介于二者之间，说明 3 种海洋脂质可以修复 DSS 处理给小鼠菌群带来的紊乱，其中 DPA 组样品的采样点与健康组较为接近，表明 DPA 对于肠道菌群紊乱的修复作用优于其他二者。对小鼠肠道微生物组成进行分析，模型组中类杆菌属，脱硫弧菌属，肠球菌属，埃希菌属/志贺氏菌属，乳球菌属，普雷沃菌属和毛螺旋菌属的丰度出现了显著的上升，而阿克曼氏菌属，理研菌属，双歧杆菌

属，布劳特氏菌属，丁酸杆菌属，真杆菌属和颤螺旋菌属的丰度出现了显著的下降。3 种海洋脂质干预显著抑制了有害菌丰度的升高及有益菌丰度的降低。对样品中微生物的丰度进行统计学分析，结果表明，DPA 对阿克曼氏菌属、理研菌属、丁酸杆菌属和埃希菌属/志贺氏菌属的调控作用显著强于 EPA 和 DHA。阿克曼氏菌属是一种利用胃肠道黏液蛋白进行生长的肠道细菌，与机体免疫应答和脂质代谢过程密切相关，对维持机体健康起着重要作用。近年来的研究表明，阿克曼氏菌在恢复肠道屏障功能和促进短链脂肪酸生成方面具有独特的作用^[26-27]。理研菌属是一种与肠易激综合征、疲劳和抑郁有关的菌属。研究表明，该菌属的丰度与宿主的体内促炎因子的表达呈负相关，表明该菌属在调控炎症反应方面发挥了重要的作用，此外该菌属与机体免疫系统的激活也密切相关^[28]。丁酸杆菌属是厚壁菌门的重要成员之一，研究表明，其在丁酸的产生过程中起着重要作用，被认为是治疗溃疡性结肠炎的一种很有前途的益生菌。丁酸作为一种常见的 SCFAs，是结肠细胞的首选产能底物。它通过促进细胞分化、细胞周期阻滞和凋亡结肠细胞的传递，在维持肠道健康方面发挥重要作用^[29]。埃希菌属/志贺氏菌属是常见的肠道病原菌，其丰度与肠道疾病的发生具有显著相关性。埃希菌属/志贺氏菌属分泌的肠毒素增加了肠道的通透性，会导致腹泻和出血，因而该菌属是反映肠炎程度的重要指标^[30]。

综上所述，3 种海洋脂质 EPA、DPA 和 DHA 均可以有效缓解 DSS 处理给小鼠带来的体质量减少、便血、稀便等症状，可以有效抑制模型小鼠结肠的缩短及水肿状况，修复小鼠肠道损伤，其中 DPA 对 UC 小鼠的干预效果优于 EPA 和 DHA。对小鼠肠道菌群多样性及组成进行分析，发现 DSS 处理显著降低了小鼠肠道菌群的多样性，改变了肠道菌群的组成，其中丰度显著增加的菌群有拟杆菌属、脱硫弧菌属、肠球菌属、埃希菌属/志贺氏菌属、乳球菌属、副杆菌属、普雷沃菌属和毛螺旋菌属，下降的有阿克曼氏菌属、理研菌属、双歧杆菌属、布劳特氏菌属、丁酸杆菌属、真杆菌属和颤螺旋菌属。3 种海洋脂质干预可以修复 UC 小鼠肠道菌群的紊乱，统计学分析结果显示，DPA 对阿克曼氏

菌属、理研菌属、丁酸杆菌属和埃希菌属/志贺氏菌属更具调控作用。本研究为海洋脂质,尤其是DPA的生物学效应提供了参考,并为膳食管控慢性疾病提供借鉴。

参考文献 (References):

- [1] Torres J, Billioud V, Sachar D B, *et al.* Ulcerative colitis as a progressive disease: the forgotten evidence[J]. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2012, 18(7): 1356-1363.
- [2] Ng S C, Shi H Y, Hamidi N, *et al.* Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies[J]. *The Lancet*, 2017, 390(10114): 2769-2778.
- [3] 陈爽. 壳寡糖对 DSS 诱导小鼠结肠炎的缓解作用研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2020.
Chen S. Ameliorating effects of chitooligosaccharides on DSS-induced colitis in mice[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020 (in Chinese).
- [4] 杨洋, 邸信, 吕晓华. 我国居民膳食变迁与慢性病问题——基于宏观数据的分析[J]. *中国社会医学杂志*, 2016, 33(2): 128-130.
Yang Y, Di X, Lv X H. Study on diet changes and population health in China: based on analysis of macro data[J]. *Chinese Journal of Social Medicine*, 2016, 33(2): 128-130(in Chinese).
- [5] 韩锐. 龙须菜多糖预防结肠炎的作用及其机理研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2020.
Han R. Study on the preventative effects of polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis* against colitis and its mechanism[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020 (in Chinese).
- [6] 曹红阳. 柚皮苷对 IBD 模型小鼠的保护作用及机制研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2020.
Cao H Y. Study of the protective effect and mechanism of Naringin on inflammatory bowel disease in mice[D]. Changchun: Jilin University, 2020 (in Chinese).
- [7] 潘登登, 孔程, 沈通一, 等. 肠道微生态干预相关慢性病的趋势与策略[J]. *中华临床营养杂志*, 2019, 27(6): 385-388.
Pan D D, Kong C, Shen T Y, *et al.* Trends and strategies of intestinal microecological intervention for chronic diseases[J]. *Chinese Journal of Clinical Nutrition*, 2019, 27(6): 385-388(in Chinese).
- [8] Ananthkrishnan A N, Bernstein C N, Iliopoulos D, *et al.* Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2018, 15(1): 39-49.
- [9] Li N, Yue H, Jia M, *et al.* Effect of low-ratio n-6/n-3 PUFA on blood glucose: a meta-analysis[J]. *Food & Function*, 2019, 10(8): 4557-4565.
- [10] Mikocka-Walus A, Andrews J M. It is high time to examine the psyche while treating IBD[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2018, 15(6): 329-330.
- [11] Punyanganie D S, Jing K, Ashwin A, *et al.* Higher serum n-6: N-3 pufa ratios in patients with mild to moderate ibd are associated with an increased rate of flare[J]. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2014, 20(S1): S5-S6.
- [12] 丛龙玲, 姚嘉茵, 吕永慧, 等. n-3多不饱和脂肪酸对克罗恩病大鼠模型的干预效果及肠道微生态菌群的影响[J]. *结直肠肛门外科*, 2020, 26(3): 324-327.
Cong L L, Yao J Y, Lü Y H, *et al.* Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids on gastrointestinal microbiota: a rat model of Crohn's disease[J]. *Journal of Colorectal & Anal Surgery*, 2020, 26(3): 324-327(in Chinese).
- [13] Murano M, Maemura K, Hirata I, *et al.* Therapeutic effect of intracolonicly administered nuclear factor κ B (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis[J]. *Clinical & Experimental Immunology*, 2000, 120(1): 51-58.
- [14] Millar A D, Rampton D S, Chander C L, *et al.* Evaluating the antioxidant potential of new treatments for inflammatory bowel disease using a rat model of colitis[J]. *Gut*, 1996, 39(3): 407-415.
- [15] 徐再玲, 施骅, 刘俊伟, 等. ω -3多不饱和脂肪酸辅助治疗溃疡性结肠炎的疗效及其机制研究[J]. *中华全科医学*, 2018, 16(4): 561-563, 596.
Xu Z L, SHI H, Liu J W, *et al.* Effect and mechanism of Omega-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of ulcerative colitis[J]. *Chinese Journal of General Practice*, 2018, 16(4): 561-563, 596(in Chinese).
- [16] 徐萍, 徐东升, 祝荫, 等. 炎症性肠病病情活动监测指标的临床价值[J]. *临床荟萃*, 2007, 22(6): 385-388.
Xu P, Xu D S, Zhu Y, *et al.* Clinical value of indices of clinical monitoring disease activity of inflammatory bowel disease[J]. *Clinical Focus*, 2007, 22(6): 385-388(in Chinese).

- 388(in Chinese).
- [17] 金若晨, 江敏, 孙世玉, 等. 凡纳滨对虾养殖环境及肠道微生物群落特征分析[J]. 水产学报, 2020, 44(12): 2037-2054.
- Jin R C, Jiang M, Sun S Y, *et al.* Microbial community in *Litopenaeus vannamei* intestine and its aquaculture environment[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(12): 2037-2054(in Chinese).
- [18] 金慧敏, 严成, 肖腾飞, 等. 高n-3多不饱和脂肪酸鱼油饮食对小鼠肠道菌群的影响[J]. 营养学报, 2017, 39(4): 366-369.
- Jin H M, Yan C, Xiao T F, *et al.* Effects of fish oil rich in n-3 polyunsaturated fatty acids on murine intestinal microbiota[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2017, 39(4): 366-369(in Chinese).
- [19] Guo X L, Li J C, Tang R Y, *et al.* High fat diet alters gut microbiota and the expression of paneth cell-antimicrobial peptides preceding changes of circulating inflammatory cytokines[J]. Mediators of Inflammation, 2017, 2017: 9474896.
- [20] Zhu X, Xiang S S, Feng X, *et al.* Impact of cyanocobalamin and methylcobalamin on inflammatory bowel disease and the intestinal microbiota composition[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(3): 916-926.
- [21] 江学良, 崔慧斐. 中国溃疡性结肠炎10218例的特点[J]. 世界华人消化杂志, 2001, 9(8): 869-873.
- Jiang X L, Cui H F. Features of ulcerative colitis in China: an analysis 10218 cases[J]. World Chinese Journal of Digestology, 2001, 9(8): 869-873(in Chinese).
- [22] 刘巧珍. 溃疡性结肠炎的治疗进展 [D]. 南昌: 南昌大学, 2017.
- Liu Q Z. Advances in treatment of ulcerative colitis[D]. Nanchang: Nanchang University, 2017 (in Chinese).
- [23] Zhu W H, Winter M G, Byndloss M X, *et al.* Precision editing of the gut microbiota ameliorates colitis[J]. Nature, 2018, 553(7687): 208-211.
- [24] Menni C, Zierer J, Pallister T, *et al.* Omega-3 fatty acids correlate with gut microbiome diversity and production of N-carbamylglutamate in middle aged and elderly women[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 11079.
- [25] Miyamoto J, Igarashi M, Watanabe K, *et al.* Gut microbiota confers host resistance to obesity by metabolizing dietary polyunsaturated fatty acids[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 4007.
- [26] Dao M C, Everard A, Aron-Wisnewsky J, *et al.* Akkermansia muciniphila and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology[J]. Gut, 2016, 65(3): 426-436.
- [27] Ouwerkerk J P, Aalvink S, Belzer C, *et al.* Akkermansia glycaniphila sp. nov., an anaerobic mucin-degrading bacterium isolated from reticulated python faeces[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(11): 4614-4620.
- [28] König J, Brummer R J. Faecal microbiota transplantation in IBS-new evidence for success?[J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2020, 17(4): 199-200.
- [29] Tye H, Yu C H, Simms L A, *et al.* NLRP1 restricts butyrate producing commensals to exacerbate inflammatory bowel disease[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 3728.
- [30] 田丽, 黄颀刚, 梁浩, 等. 炎症性肠病患者肠道菌群的临床研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2020, 34(2): 180-185.
- Tian L, Huang J G, Liang H, *et al.* Clinical study on dysbiosis of intestinal microbiota in patients with inflammatory bowel disease[J]. Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology, 2020, 34(2): 180-185(in Chinese).

Effects of three different marine lipids on ulcerative colitis mice and their gut microbiome

ZHU Kai¹, DAI Zhiyuan^{1,2,3}, SHEN Qing^{1,2,3}, ZHENG Zhenxiao^{1,2,3*}

(1. Institute of Seafood, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310012, China;

2. State Key Laboratory of Aquatic Products Processing of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China;

3. Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310012, China)

Abstract: Ulcerative colitis recently has become an increasingly common disease worldwide, mainly due to people's unbalanced daily diets. The effects of three different marine lipids, namely eicosapentaenoic acid (EPA), docosapentaenoic acid (DPA) and docosahexaenoic acid (DHA), on ulcerative colitis mice and influences on their intestinal flora were studied. In the present study, the C57BL/6 mice were used as experimental model, induced by dextran sulfate sodium (DSS); The protective effects of these three kinds of marine lipids on ulcerative colitis were evaluated by the indexes of the body weight loss, disease activity index (DAI) score, the morphology of colon, the length of colon, the ratio of colon weight to length, the microscopic images of colon sections stained with hematoxylin-eosin (H.E) and histological damage score; 16S *rDNA* high-throughput sequencing method was adopted to characterize the influences of these three marine lipids on the microecological changes of intestinal flora in mice. DAI of EPA, DPA, DHA and model group increased 0.33-3.33, 0.33-2.67, 0-3.00, 0.33-4.00 respectively; length of colon tissue increased by 21.12%, 21.90% and 22.29% in EPA, DPA and DHA group compared to model mice (5.16 cm); the ratio of colon weight to length of EPA, DPA and DHA group reduced by 22.18%, 22.15% and 24.55% compared with model mice; mice treated with EPA, DPA and DHA showed lower histological damage score (2.51, 2.16, 2.23 respectively) while DSS treated mice showed worse intestinal morphology (3.51). The results of pathological indexes showed that the decrease of body weight, the increase of DAI, the shortening of the colon tissue and the increase of histological damage score were significantly inhibited by the supplementation with these three kinds of marine lipids, compared with the model group. Moreover, DPA was more effective in the prevention of the loss of body weight, the increase of disease activity index score and the increase of the histological damage score than EPA and DHA. Higher abundance of *Akkermansia*, *Alistipes*, *Bifidobacterium*, *Blautia*, *Butyricoccus*, *Eubacterium* and *Oscillibacter* and lower abundance of *Allobaculum*, *Bacteroides*, *Desulfovibrio*, *Enterococcus*, *Escherichia/Shigella*, *Lactococcus*, *Prevotella* and *Lachnospiraceae* were showed in mice treated with EPA, DPA and DHA by 16S *rDNA* high-throughput sequencing, compared with the model group. The results represented the significantly regulatory effect of these three kinds of marine lipids on intestine flora ecology. In addition, DPA was more effective in the regulation of the relative abundance of *Akkermansia*, *Alistipes*, *Butyricoccus* and *Escherichia/Shigella*, compared with EPA and DHA. All these findings indicated that EPA, DPA and DHA, these three kinds of marine lipids could significantly alleviate the symptoms of UC, and the composition and structure of intestinal flora in UC mice were significantly affected by the supplementation of these three kinds of marine lipids. Based on these, we assumed that the regulation effect of these three kinds of marine lipids on UC was related to their regulation effect on the specific intestinal microorganisms. We hope this study could provide important reference for the research of biological effects of marine active lipids, especially for the biological effects of DPA. Moreover, we hope this study could also provide important reference for the dietary control of chronic diseases.

Key words: marine lipids; ulcerative colitis; 16S *rDNA* sequencing; gut microbiome

Corresponding author: ZHENG Zhenxiao. E-mail: zheng_zhen_xiao@163.com

Funding project: National Key R & D Program of China (2018YFC0311204)