

# 孕前和孕期高脂饲料喂养对新生大鼠肠道菌群的影响

胡卓, 杨倩, 魏宇辰, 蔡夏夏, 党秦豫, 朱砚荻, 张亚迪, 陈朝阳, 余焕玲  
首都医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学系, 北京 100069

**摘要:**目的 探讨孕前和孕期高脂饲料喂养对新生大鼠肠道菌群的影响。方法 12 只 3 周龄无特定病原体 (Specific Pathogen Free, SPF) 级雌性 Sprague - dawley (SD) 大鼠, 适应性喂养一周后, 按体重随机分为对照组与高脂组, 孕前分别用基础饲料与高脂饲料喂养至 12 周龄, 与同周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠合笼, 次日观察到阴道栓或阴道涂片中发现精子后, 判定受孕。孕鼠单笼饲养, 孕期的饲料与孕前相同。收集出生后第 0.5 天 (postnatal day 0.5, PD 0.5) 仔鼠, 称量体重, 采集肠道组织并称量质量, 计算肠道系数; 进行回肠和结肠组织病理和相关基因检测; 提取肠道内容物的细菌总 DNA, 通过 16S rRNA 测序分析肠道菌群。采用  $t$  检验或 Mann - Whitney  $U$  检验分析数据。结果 与对照组相比, 高脂组 PD 0.5 仔鼠体重、肠道质量、肠道系数无显著改变 ( $t = -0.682, P = 0.499; t = 0.269, P = 0.790; t = 0.674, P = 0.506$ ); 肠道病理形态无改变; 结肠闭合蛋白 - 1 (Claudin - 1)、溶菌酶 (Lysozyme)、再生胰岛衍生蛋白 3 伽马 (regenerating islet derived protein 3 gamma, Reg3 $\gamma$ ) 和  $\alpha$  - 防御素 5 (Alpha - defensin 5) 的基因表达水平显著增加 ( $t = -3.136, P = 0.011; t = -3.303, P = 0.019; t = -3.093, P = 0.011; t = -3.575, P = 0.005$ ); 肠道菌群的  $\alpha$  多样性和  $\beta$  多样性无显著改变 ( $t = -1.407, P = 0.190; t = -1.410, P = 0.189; t = -2.017, P = 0.071; U = 6.000, P = 0.055; F = 1.030, P = 0.141$ ); 肠道瘤胃球菌属、考拉杆菌属、Lachnospiraceae\_incertae\_sedis、韦荣氏球菌属、黄杆菌属和 Bacteroides\_sp.\_SLC1 - 38 的丰度显著增加 ( $U = 3.500, P = 0.013; U = 7.000, P = 0.050; U = 6.000, P = 0.022; U = 6.000, P = 0.022; U = 7.000, P = 0.050; U = 3.000, P = 0.007$ ); 线性判别分析效应量 (Linear discriminant analysis Effect Size, LEfSe) 分析表明高脂组中对差异影响贡献较大的物种有埃希氏菌属/志贺氏菌属、瘤胃球菌属、考拉杆菌属、Lachnospiraceae\_incertae\_sedis 和 Bacteroides\_SP.\_SLC1 - 38。结论 孕前和孕期高脂饲料喂养导致 PD 0.5 仔鼠肠道代谢相关菌和致病菌的丰度增加。

**关键词:** 高脂饮食; 子代; 肠道菌群; 16S rRNA

中图分类号: R117 文献标志码: A 文章编号: 1003 - 8507(2024)04 - 697 - 08

DOI: 10.20043/j.cnki.MPM.202311248

## Effects of high - fat diet in pre - pregnancy and pregnancy on gut microbiota of neonatal rats

HU Zhuo, YANG Qian, WEI Yu - chen, CAI Xia - xia, DANG Qin - yu, ZHU Yan - di,  
ZHANG Ya - di, CHEN Zhao - yang, YU Huan - ling

Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Public Health, Capital Medical University, Beijing 100069, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the effects of high - fat diet in pre - pregnancy and pregnancy on gut microbiota of neonatal rats. **Methods** Twelve 3 - week - old Specific Pathogen Free (SPF) female Sprague - dawley (SD) rats after one week of adaptive feeding were randomly divided into control group and high - fat diet group according to body weight. The rats were fed basal diet or high - fat diet until 12 - week - old in pre - pregnancy, respectively, and then mated with SPF male SD rats of the same age. Pregnancy was determined the next day when vaginal plugs were observed or sperms were found by vaginal smears. Pregnant rats were kept in single cages and the diet in pregnancy was the same as pre - pregnancy. The postnatal day 0.5 (PD 0.5) neonatal rats were collected and the body weights were measured. Intestine of PD 0.5 neonatal rats were collected, intestinal weights were measured and intestinal coefficients were calculated. Histopathology and related genes detection of ileum and colon were performed. Total bacterial DNA of intestinal contents was extracted and the gut microbiota was analyzed by 16S rRNA sequencing. Data was analyzed by  $t$  test or Mann - Whitney  $U$  test. **Results** Compared with control group, there were no significant difference in the body weight, intestinal weight and intestinal coefficient in PD 0.5 neonatal rats of high - fat diet group ( $t = -0.682, P = 0.499; t = 0.269, P = 0.790; t = 0.674, P = 0.506$ ); there were no

基金项目: 北京市教育委员会科技/社科计划项目 (KZ202210025039)

作者简介: 胡卓 (1999 -), 男, 硕士在读, 研究方向: 营养与疾病

通信作者: 余焕玲, E - mail: yuhlzjl@ccmu.edu.cn

difference in intestinal histopathological changes; the gene expression level of *Claudin - 1*, *Lysozyme*, *Reg3γ* (regenerating islet derived protein 3 gamma) and *Alpha - defensin 5* of colon in PD 0.5 neonatal rats of high - fat diet group were increased significantly ( $t = -3.136, P = 0.011$ ;  $t = -3.303, P = 0.019$ ;  $t = -3.093, P = 0.011$ ;  $t = -3.575, P = 0.005$ ); there were no significant difference in  $\alpha$  diversity and  $\beta$  diversity of gut microbiota ( $t = -1.407, P = 0.190$ ;  $t = -1.410, P = 0.189$ ;  $t = -2.017, P = 0.071$ ;  $U = 6.000, P = 0.055$ ;  $F = 1.030, P = 0.141$ ); the abundance of *Ruminococcus*, *Phascolarctobacterium*, *Lachnospiraceae\_incertae\_sedis*, *Veillonella* and *Flavobacterium* and *Bacteroides\_sp.\_SLC1 - 38* increased significantly ( $U = 3.500, P = 0.013$ ;  $U = 7.000, P = 0.050$ ;  $U = 6.000, P = 0.022$ ;  $U = 6.000, P = 0.022$ ;  $U = 7.000, P = 0.050$ ;  $U = 3.000, P = 0.007$ ). The Linear discriminant analysis Effect Size (LEfSe) analysis found that *Escherella/Shigella*, *Ruminococcus*, *Phascolarctobacterium*, *Lachnospiraceae\_incertae\_sedis* and *Bacteroides\_SP.\_SLC1 - 38* were bacteria with effects on the differences in high - fat diet group greater than the set value. **Conclusion** High - fat diet in pre - pregnancy and pregnancy increased the abundance of metabolically related bacteria and pathogenic bacteria in the gut of PD 0.5 neonatal rats.

**Keywords:** High - fat diet; Offspring; Gut microbiota; 16s rRNA

肠道菌群是一个由多达 100 万亿个微生物组成的复杂群落,对宿主的生长发育、营养吸收与代谢、免疫屏障等具有重要作用<sup>[1-2]</sup>。新生儿肠道菌群的定植始于分娩,是一个复杂微生物群落从头组装的动态过程,自然分娩时,来自母亲阴道和粪便的菌群构成了子代肠道菌群定植的基础<sup>[3-5]</sup>。肠道菌群初始定植的改变会对未来的定植产生影响,与后续生命过程中的心血管疾病、肥胖和神经系统疾病等的发生和发展相关<sup>[6-10]</sup>。

母亲高脂饮食会影响子代肠道菌群。Ma 等人发现孕期和哺乳期高脂饲料喂养的日本猕猴,其 1 岁子代的肠道弯曲杆菌属、螺杆菌属丰度降低,瘤胃球菌属和戴阿利斯特菌属的丰度增加<sup>[11]</sup>;Myles 等人发现孕期高脂饲料喂养的小鼠,断乳子代的肠道菌群  $\alpha$  多样性降低,梭菌目和毛螺菌科的丰度增加<sup>[12]</sup>。上述研究提示孕期高脂饮食与子代肠道菌群的多样性以及某些细菌的丰度存在关联。饮食是影响肠道菌群组成的重要环境因素<sup>[13-14]</sup>,随着生活水平的日益改善,我国居民膳食逐渐呈现高能量、高脂肪、高蛋白、低膳食纤维的西方膳食模式特点,脂肪的供能比显著增加<sup>[15]</sup>。目前,虽然有研究发现了孕前和孕期高脂饮食与子代肠道菌群之间的关联,但是,这种关联是否始于肠道微生物的初始定植,则不清楚。为此,本研究于孕前和孕期连续饲喂 Sprague - dawley (SD)大鼠高脂饲料,观察出生后第 0.5 天 (postnatal day 0.5, PD 0.5) 仔鼠的肠道病理形态、屏障功能和肠道菌群,探讨孕前和孕期高脂饲料喂养对 PD 0.5 子代肠道菌群的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物与分组** 12 只 3 周龄无特定病原体 (Specific Pathogen Free, SPF) 级雌性 Sprague - dawley (SD)大鼠,购自北京维通利华实验动物技术有限公

司,饲养于首都医科大学实验动物中心,环境温度为 (20 ± 2) °C、光/暗各 12 h,自由饮水和摄食。适应性喂养一周后,按体重随机分为对照组与高脂组,孕前分别用基础饲料与高脂饲料喂养至 12 周龄,与同周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠以 3:1 的比例合笼过夜。次日,若观察到阴道栓或阴道涂片中发现精子,判定为受孕成功。孕鼠单笼饲养,孕期的饲料与孕前相同。收集 PD 0.5 仔鼠,每组分别随机选取 20 只进行称重,用 300 mg/kg 三溴乙醇进行麻醉,解剖肠道组织后称量质量,计算肠道系数,分离回肠组织和结肠组织。分别提取回肠组织和结肠组织的 mRNA;无菌环境采集肠道的全部内容物,提取细菌总 DNA,用于后续实验。所有的检测样品均未进行混合,各个检测指标中每组 PD 0.5 仔鼠分别来自 2 ~ 3 只不同的母鼠。实验操作得到首都医科大学医学伦理委员会批准 (伦理号:AEI - 2021 - 136)。

**1.2 动物饲料** 饲料购自北京华阜康生物科技股份有限公司,基础饲料 (型号:D12450B) 和高脂饲料 (型号:D12492) 宏量营养素的供能比和能量密度见表 1。

表 1 饲料中的宏量营养素供能比和能量密度

**Table 1** The energy supply ratios of macronutrients and energy densities of the diets

供能比	基础饲料	高脂饲料
碳水化合物 (%)	70	20
蛋白质 (%)	20	20
脂肪 (%)	10	60
能量 (kcal/g)	3.85	5.24

**1.3 肠道组织病理** 取 PD 0.5 仔鼠回肠和结肠组织,经 4% 多聚甲醛溶液固定、脱水、石蜡包埋、切片、染色和封片后,在光学显微镜下观察肠道病理形态。用苏木精 - 伊红 (Hematoxylin - Eosin, HE) 染色观察回肠和结肠组织形态,并测量绒毛长度和隐窝深度;用阿尔新蓝/高碘酸雪夫 (Alcian Blue - Periodic Acid

Schiff, AB - PAS) 染色观察回肠和结肠中的杯状细胞, 并进行计数; 用荧光桃红染色观察回肠中的潘氏细胞, 并进行计数。每个样本组织切片取 5 个完整绒毛或隐窝视野。

**1.4 定量聚合酶链反应** 使用磁珠法组织总 RNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)分别从 PD 0.5 仔鼠的回肠和结肠组织提取 RNA, 按照 RNA 逆转录试剂盒(赛默飞生物公司)要求将 RNA 反转录成 cDNA。按照 SYBR 试剂盒(近岸蛋白质科技股份有限公司)说明书配置 qPCR 反应液并设置扩增条件。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 序列见表 2。用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示目的基因的相对表达量。

表 2 内参基因及目的基因引物序列

Table 2 Primer sequences of reference gene and target genes

基因	序列(5' to 3')
$\beta$ -actin	F: GGTGAGGTCATCACTATCGGCAATG R: CAGCACTGTGTTGGCATAGAGGTC
Ocludin	F: CAACGGCAAAGTGAATGGCAAGAG R: TCATCCACGGACAAGGTCAGAGG
ZO-1	F: CAAGCCAGTCCATFTCTCAGAGTCAG R: TCCATAGCATCAGTTTCGGGTTTCC
Claudin-1	F: GTGTGACACGGCGGAAGGAAG R: ACTCAGTGGAAGCAGCAGTTC
MUC2	F: CTCACCAACCACCTCAACCACCTTC R: TCCAGAATCCAGCCAGCCAGTC
Lysozyme	F: CCGCACAGTCTCACACACAC R: GTTCAGGCAGTCTCAGTTCTCATCC
Reg3 $\gamma$	F: AGTGGAAGATGCCAAGGAAGATGTG R: GATCCACTGAGCACAGACACAAGG
Alpha-defensin 5	F: ACTCTGCTTACCGCCCTTCTCC R: GTCACGCCTGCCTTCACATCTG

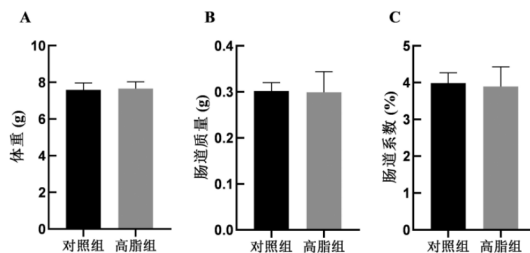
**1.5 肠道菌群分析** 无菌环境收集 PD 0.5 仔鼠肠道的全部内容物, 提取肠道菌群的总 DNA, 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的完整性; 电泳条带清晰可见, 无明显降解; Nanodrop 2000 检测基因组 DNA 质量: 浓度  $\geq 20$  ng/ $\mu$ l, 总量  $\geq 500$  ng, OD260/280 = 1.8 ~ 2.0。对于合格的样本检测区域进行高保真 PCR 扩增, 扩增引物选定的检测区域为 V3 - V4 区域。扩增后产物琼脂糖凝胶电泳检测, 应用核酸纯化磁珠对扩增产物进行纯化, 得到样本的原始文库。文库检测合格后, 采用 NovaSeq 6000 平台, SP - Xp (PE250) 的双端测序策略对文库进行测序, 后续进行生物信息学分析。使用 QIIME2 的 DADA2 插件进行质控后直接生成扩增序列变体 (amplicon sequence variant, ASV) 和操作分类单元 (Operational Taxonomic Unit, OTU)。使用 QIIME2 软件对 ASV/OTU 序列进行物种注释。注释方法: classify - sklearn。对 ASV/OTU 分类学表进行各分类水平物种注释情况统计。

用韦恩图展示每组样本中特有的以及组间共有的 ASV / OTU。分析 ACE 指数、Chao1 指数、shannon 指数、Simpson 指数等展示肠道菌群的  $\alpha$  多样性。主坐标分析 (Principal Coordinate Analysis, PCoA) 检测  $\beta$  多样性, 同时使用基于 Bray - curtis 距离的 ADONIS 分析检验组间  $\beta$  多样性的差异。柱状图反映两组门、属水平上的物种组成。 $t$  检验或 Mann - Whitney  $U$  检验分析组间差异的物种, 检验水准  $\alpha = 0.05$ 。线性判别分析效应量 (Linear discriminant analysis Effect Size, LEfSe) 分析筛选最可能解释组间差异的物种, 线性判别分析 (Linear discriminant analysis, LDA) 评估每个差异显著的物种的效应值, 以 LDA score  $> 3$  作为差异显著性阈值。

**1.6 统计学处理** 利用 SPSS 26.0 软件和在线工具 ImageGP<sup>[16]</sup> 对数据进行处理和分析。计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。两组间数据比较采用  $t$  检验或 Mann - Whitney  $U$  检验, 检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 孕前和孕期高脂饲料喂养对 PD 0.5 仔鼠生长发育的影响** 结果显示, PD 0.5 仔鼠的体重、肠道质量以及肠道系数在对照组和高脂组之间无统计学差异 ( $t = -0.682, P = 0.499; t = 0.269, P = 0.790; t = 0.674, P = 0.506$ ) (见图 1)。



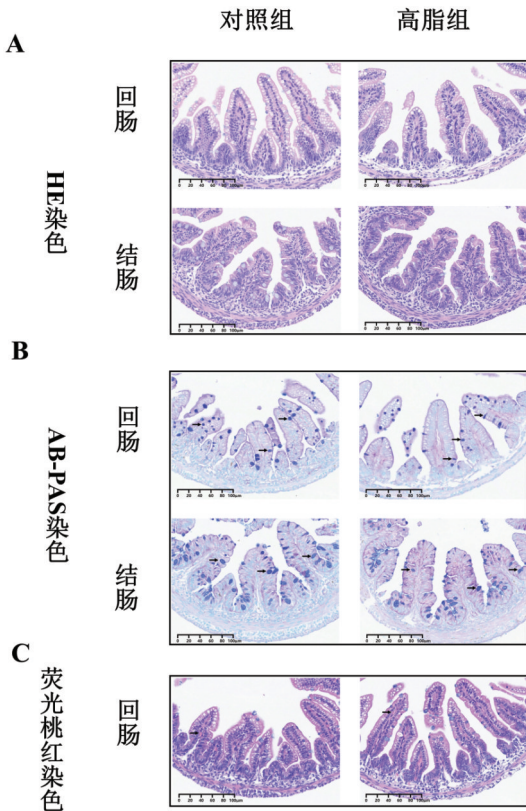
注: A: 体重; B: 肠道质量; C: 肠道系数。n = 20。

图 1 PD 0.5 仔鼠的体重、肠道质量和肠道系数

Fig. 1 Body weight, intestinal weight and intestinal coefficient of PD 0.5 neonatal rats

**2.2 孕前和孕期高脂饲料喂养对 PD 0.5 仔鼠肠道形态的影响** HE 染色结果显示, 对照组和高脂组 PD 0.5 仔鼠肠道绒毛和隐窝表面单层柱状细胞均排列紧密, 细胞形态正常 (见图 2A), 统计分析发现回肠绒毛高度和结肠隐窝深度在两组间无统计学差异 ( $t = -1.827, P = 0.076; t = 0.126, P = 0.901$ ) (见图 3A 和 3B)。AB - PAS 染色将杯状细胞染为深蓝色 (见图 2B), 统计分析发现, 回肠和结肠内杯状细胞数量在两组间无统计学差异 ( $t = -0.464, P = 0.646; t = 0.137, P = 0.892$ ) (见图 3C 和 3D)。荧光桃红染色

将潘氏细胞染为品红色(见图 2C),统计分析发现,回肠潘氏细胞数量在两组间无统计学差异( $U = 164.500, P = 0.327$ )(见图 3E)。



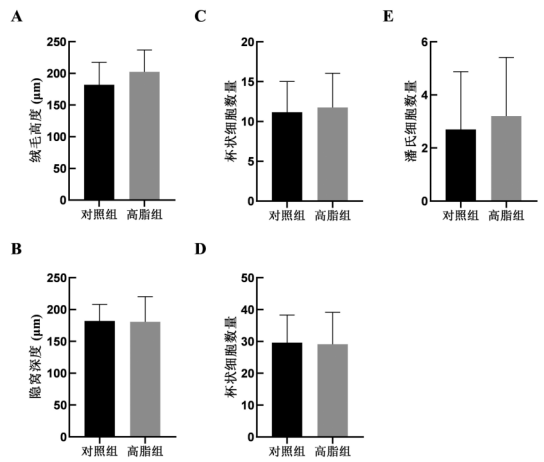
注:A: HE 染色( $\times 200$ ); B: AB-PAS 染色( $\times 200$ ); C: 荧光桃红染色( $\times 200$ )。

图 2 PD 0.5 仔鼠肠道组织病理形态

Fig. 2 Histopathology of intestinal tissues of PD 0.5 neonatal rats

**2.3 孕前和孕期高脂饲料喂养对 PD 0.5 仔鼠肠道紧密连接蛋白和黏蛋白 mRNA 表达水平的影响** 肠道紧密连接蛋白和黏蛋白与肠道屏障功能密切相关,阻止微生物侵入肠道上皮。与对照组相比,高脂组 PD 0.5 仔鼠回肠组织中咬合蛋白(Occludin)、闭锁小带蛋白-1(zona occludens-1, ZO-1)、闭合蛋白-1(Claudin-1)和黏蛋白 2(Mucin 2, MUC2)的基因表达水平无显著改变( $t = -0.190, P = 0.853; t = 1.068, P = 0.311; t = 0.207, P = 0.840; t = 1.003, P = 0.340$ )。与对照组相比,高脂组 PD 0.5 仔鼠结肠组织中 Occludin、ZO-1 和 MUC2 基因的表达水平的无显著改变( $U = 13.000, P = 0.423; t = -0.527, P = 0.610; U = 8.000, P = 0.109$ ); Claudin-1 基因的表达水平显著升高( $t = -3.136, P = 0.011$ )(见图 4)。

**2.4 孕前和孕期高脂饲料喂养对 PD 0.5 仔鼠肠道抗菌肽 mRNA 表达水平的影响** 肠道抗菌肽对抵御



注:A、C、E:回肠组织绒毛高度、杯状细胞数量、潘氏细胞数量;B、D:结肠组织隐窝深度、杯状细胞数量。回肠组织  $n = 4$ , 结肠组织  $n = 3$ 。

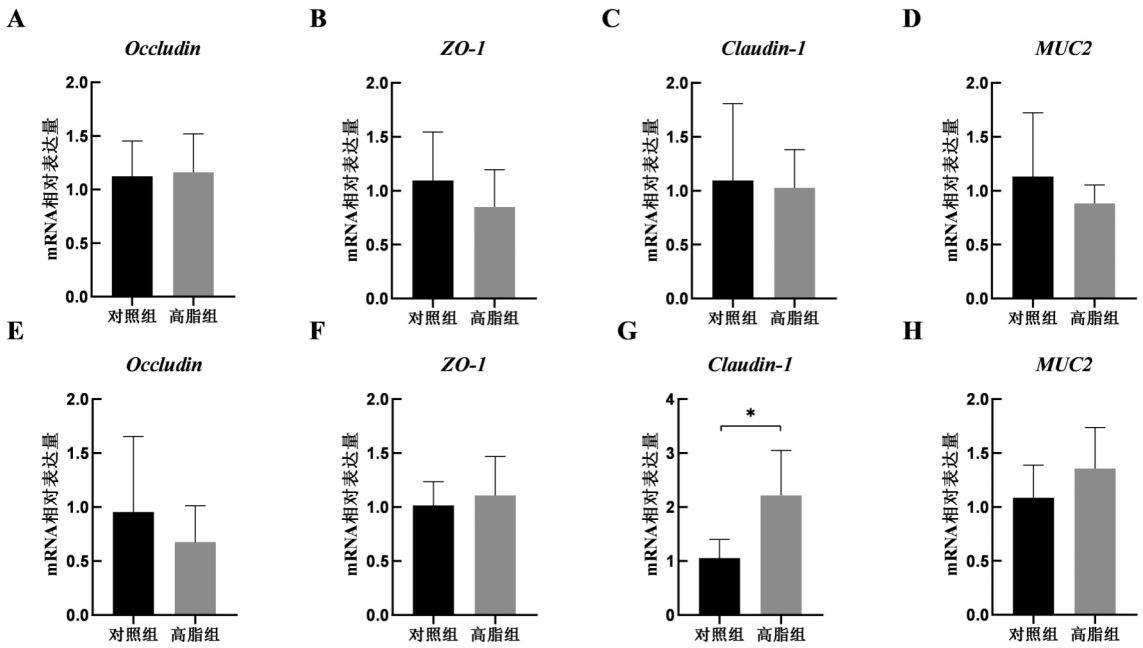
图 3 PD 0.5 仔鼠肠道组织绒毛高度、隐窝深度、杯状细胞数量和潘氏细胞数量差异分析

Fig. 3 Difference analysis of villus height, crypt depth, goblet cell number and Paneth cell number of intestinal tissues of PD 0.5 neonatal rats

微生物和防止感染至关重要。与对照组相比,高脂组 PD 0.5 仔鼠回肠溶菌酶(Lysozyme)、再生胰岛衍生蛋白 3 伽马(regenerating islet derived protein 3 gamma, Reg3 $\gamma$ )和  $\alpha$ -防御素 5(Alpha-defensin 5)的基因表达水平无显著改变( $t = -0.465, P = 0.652; t = -0.118, P = 0.908; t = 0.183, P = 0.859$ ); 结肠 Lysozyme、Reg3 $\gamma$  和 Alpha-defensin 5 基因的表达水平显著升高( $t = -3.303, P = 0.019; t = -3.093, P = 0.011; t = -3.575, P = 0.005$ )(见图 5)。

**2.5 孕前和孕期高脂饲料喂养对 PD 0.5 仔鼠肠道菌群的影响**

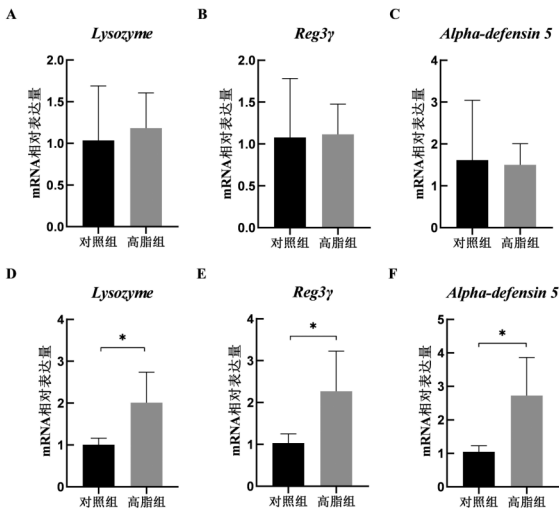
**2.5.1 肠道菌群多样性** 为了研究孕前和孕期高脂饲料喂养对 PD 0.5 仔鼠肠道菌群结构的影响,我们分析了肠道菌群 ASV/OTU 数量,  $\alpha$  多样性和  $\beta$  多样性。结果显示,对照组特有的 ASV/OTU 为 2068 种,高脂组特有的 ASV/OTU 为 2878 种,两组共有的 ASV/OTU 为 396 种(见图 6A)。我们分别用 ACE 和 Chao1 指数反映肠道菌群的丰富度,用 Shannon 和 Simpson 指数反映肠道菌群的多样性,结果显示两组之间无统计学差异( $t = -1.407, P = 0.190; t = -1.410, P = 0.189; t = -2.017, P = 0.071; U = 6.000, P = 0.055$ )(见图 6B)。用 PCoA 和基于 Bray-curtis 距离的 ADONIS 分析反映肠道菌群的  $\beta$  多样性,结果显示第一主成分 PCoA1 和第二主成分 PCoA2 对区分两组的贡献度分别为 10.6% 和 10.1%,两组间  $\beta$  多样性无统计学差异( $F = 1.030, P = 0.141$ )(见图 6C)。



注:A - D:回肠组织 *Occludin*, *ZO-1*, *Claudin-1*, *MUC2* 表达水平;E - H:结肠组织 *Occludin*, *ZO-1*, *Claudin-1*, *MUC2* 表达水平。 $n = 6$ , \*  $P < 0.05$ ,下同。

图 4 PD 0.5 仔鼠肠道 *Occludin*, *ZO-1*, *Claudin-1*, *MUC2* 的 mRNA 水平

Fig. 4 The mRNA expression level of *Occludin*, *ZO-1*, *Claudin-1*, *MUC2* of intestinal tissues of PD 0.5 neonatal rats



注:A - C:回肠组织 *Lysozyme*, *Reg3γ*, *Alpha-defensin 5* 表达水平;D - F:结肠组织 *Lysozyme*, *Reg3γ*, *Alpha-defensin 5* 表达水平。

图 5 PD 0.5 仔鼠肠道抗菌肽的 mRNA 水平

Fig. 5 The mRNA expression level of antimicrobial peptides of intestinal tissues of PD 0.5 neonatal rats

**2.5.2 肠道菌群组成和差异** 在门水平上,PD 0.5 仔鼠肠道的主要优势菌群为厚壁菌门,变形菌门,拟杆菌门和放线菌门等(见图 7A),各菌门的差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。

在属水平上,PD 0.5 仔鼠肠道的主要优势菌群为埃希氏菌属/志贺氏菌属,拟杆菌属,葡萄球菌属和乳杆菌属等(见图 7B)。高脂组 PD 0.5 仔鼠肠道瘤

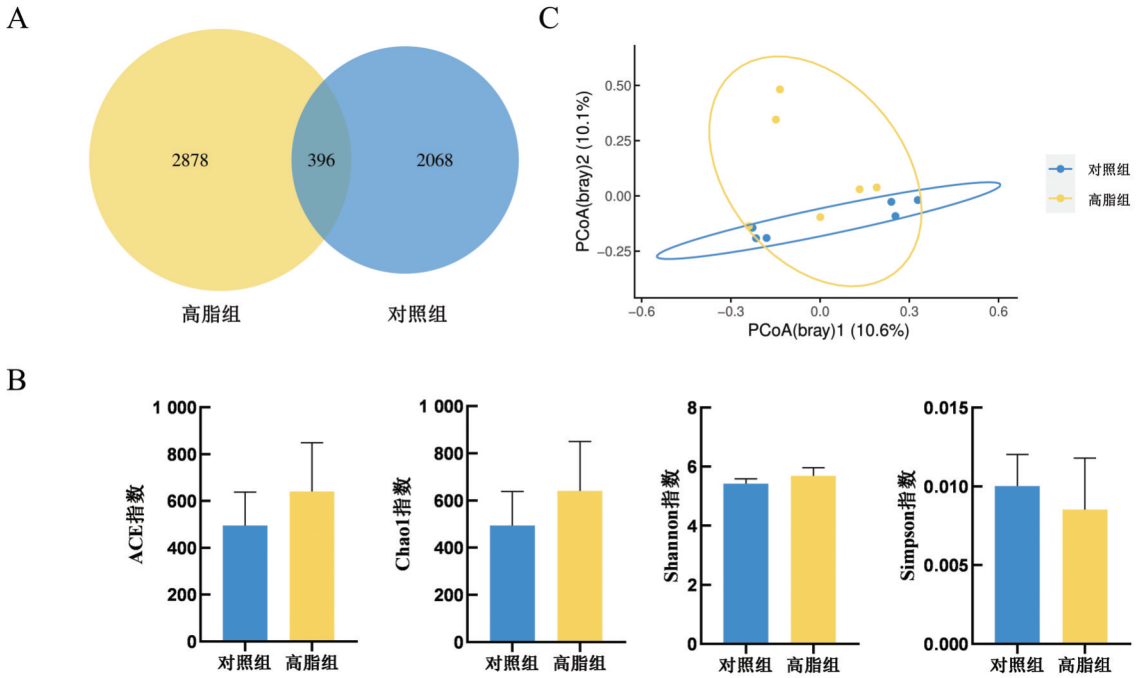
胃球菌属、考拉杆菌属、*Lachnospiraceae\_incertae\_sedis*、韦荣氏球菌属和黄杆菌属的丰度显著高于对照组( $U = 3.500$ ,  $P = 0.013$ ;  $U = 7.000$ ,  $P = 0.050$ ;  $U = 6.000$ ,  $P = 0.022$ ;  $U = 6.000$ ,  $P = 0.022$ ;  $U = 7.000$ ,  $P = 0.050$ );其余菌属的差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )(见图 7C)。

在种水平上,高脂组 PD 0.5 仔鼠肠道 *Bacteroides\_SP.\_SLC1-38* 的丰度显著高于对照组( $U = 3.000$ ,  $P = 0.007$ ),其余菌种的差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )(见图 7C)。

LEfSe 分析统计了对各组间差异的影响大于设定值(LDA Score = 3)的差异物种。在属水平上,高脂组 PD 0.5 仔鼠肠道埃希氏菌属/志贺氏菌属、瘤胃球菌属、考拉杆菌属、*Lachnospiraceae\_incertae\_sedis* 的丰度较高;在种水平上,高脂组 PD 0.5 仔鼠肠道 *Bacteroides\_SP.\_SLC1-38* 的丰度较高(见图 7D)。

### 3 讨论

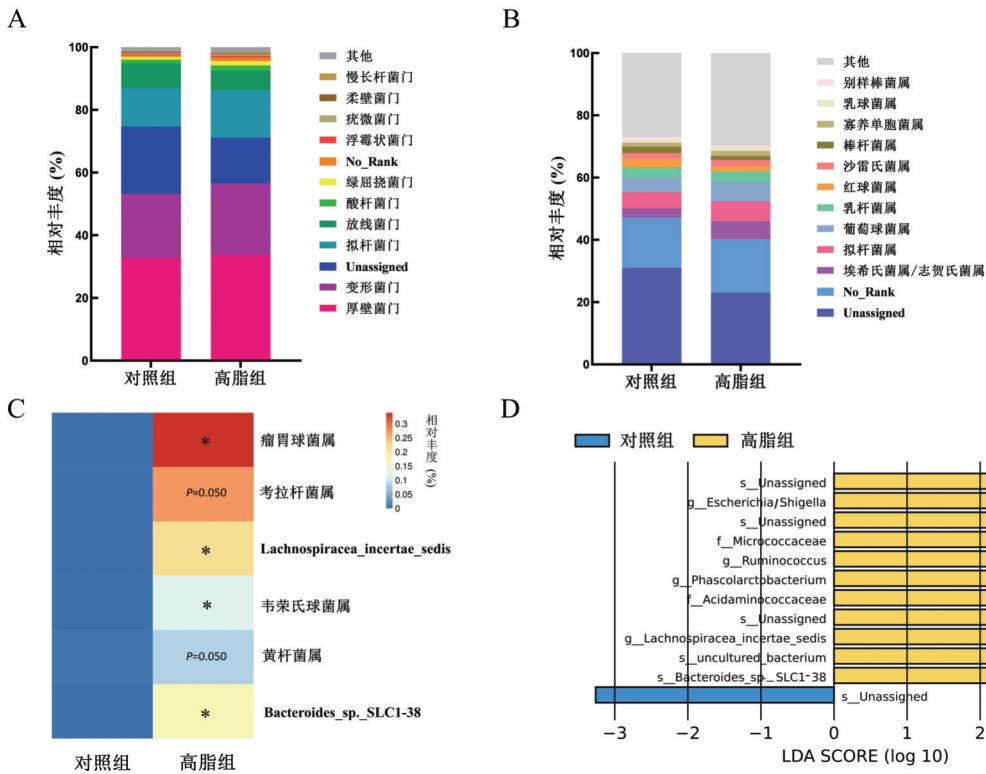
本研究发现,孕前和孕期高脂饲料喂养对 PD 0.5 仔鼠的体重、肠道质量、肠道系数以及肠道绒毛和隐窝表面单层柱状细胞形态无显著影响;但可导致 PD 0.5 仔鼠肠道瘤胃球菌属、考拉杆菌属、*Lachnospiraceae\_incertae\_sedis*、韦荣氏球菌属、黄杆菌属、埃希氏菌属/志贺氏菌属和 *Bacteroides\_sp.\_SLC1-38* 的丰度显著增加,同时结肠组织 *Claudin-1*,



注:A:韦恩图;B:α多样性指数;C:PCoA图。

图6 肠道菌群多样性分析

Fig. 6 Diversity analysis of gut microbiota



注:A:门水平物种组成柱状图;B:属水平物种组成柱状图;C:差异肠道菌群热图;D:LDA条形图。Unassigned:分类学比对时在设定的置信阈值以下,No\_Rank:在门/属上没有明确的分类信息或分类名称。

图7 肠道菌群组成和差异分析

Fig. 7 Composition and difference analysis of gut microbiota

Lysozyme 和 Reg3γ 和 Alpha - defensin 5 基因的表达水平增加。

Myles 等人发现与标准低脂饲料(脂肪供能比10%)组相比,孕期高脂饲料(脂肪供能比40%)喂养

的小鼠,断乳子代的肠道菌群  $\alpha$  多样性(Shannon 指数)降低<sup>[12]</sup>。Chu 等人建立前瞻性队列,通过膳食问卷评估母亲分娩前近一个月的膳食脂肪摄入量,并收集新生儿胎粪,进行 16S rRNA 测序和分析,结果发现母亲高脂饮食组(膳食脂肪摄入量 43.1%)的新生儿胎粪微生物  $\beta$  多样性与对照组(膳食脂肪摄入量 24.4%)间存在显著差异<sup>[17]</sup>。本研究以大鼠为模型,于孕前 8 周开始高脂饲料喂养并持续至分娩,高脂组 PD 0.5 仔鼠肠道菌群的  $\alpha$  多样性有增加的趋势,但无统计学差异。这些研究结果提示,新生儿肠道菌群多样性可能受母亲孕期膳食组分的影响,但未来仍需要有更多的实验室研究和临床试验提供高质量的证据。

瘤胃球菌属在宿主碳水化合物的代谢中起着至关重要的作用。Ma 等人发现孕期和哺乳期高脂饲料喂养的日本猕猴,其 1 岁子代的肠道瘤胃球菌属的丰度增加<sup>[11]</sup>。研究发现成年糖尿病患者肠道瘤胃球菌属的丰度增加<sup>[18]</sup>。另一项研究通过比较肥胖和非肥胖人群的粪便菌群,发现肥胖组酒神瘤胃球菌、卵瘤胃球菌丰度显著增加<sup>[19]</sup>。研究发现高脂饮食更有可能导致大量产生丙酸和乙酸的细菌在肠道聚集,如韦荣氏球菌科和考拉杆菌属,两者的丰度与体重增加等肥胖相关的代谢参数成正相关<sup>[20-21]</sup>。Lachnospiraceae\_incertae\_sedis 参与碳水化合物的代谢,可以产生短链脂肪酸<sup>[22-23]</sup>。母亲高脂饮食增加子代超重肥胖、二型糖尿病、心血管疾病等代谢性疾病等的发生风险<sup>[24]</sup>。本研究发现高脂组 PD 0.5 仔鼠肠道的瘤胃球菌属、考拉杆菌属、韦荣氏球菌属和 Lachnospiraceae\_incertae\_sedis 的丰度显著增加,其是否能持续到幼年甚至成年,并参与肥胖和二型糖尿病等的发生,尚需进一步研究。

黄杆菌属是一种条件致病菌,其丰度增加与潜在感染风险增加相关。埃希氏菌属/志贺氏菌属可以黏附和侵入肠道上皮细胞,释放毒素和代谢产物,其丰度的增加可能与肠道黏膜的损伤和炎症反应有关<sup>[25-26]</sup>。Occludin,ZO-1,Claudin-1 等蛋白参与紧密连接的形成,在肠道上皮细胞构成的物理屏障中发挥重要的防护作用<sup>[27]</sup>。MUC2 是杯状细胞合成和分泌的黏蛋白,作为肠道黏液的重要成分,参与形成肠道物理屏障<sup>[28]</sup>。抗菌肽参与组成了肠道黏膜的化学屏障:Alpha-defensin 5 和 Lysozyme 可抑制革兰阳性菌和革兰阴性菌,Reg3 $\gamma$  可以抑制革兰阳性菌<sup>[29-30]</sup>。我们检测了这些蛋白的基因表达水平,表征肠道的物理屏障和化学屏障功能,评估其抵御微生物和防止致病菌感染的水平。本研究发现高脂组 PD 0.5 仔鼠结肠中 Claudin-1, Lysozyme, Reg3 $\gamma$  和 Alpha-defensin 5

等的 mRNA 表达水平显著高于对照组。这些基因表达水平的增加可能是一种内源性保护肠上皮屏障的补偿机制,通过增加肠道上皮细胞的紧密连接和抗菌肽的分泌,保护宿主免受黄杆菌属、埃希氏菌属/志贺氏菌属等致病细菌感染。

本研究对孕前和孕期高脂饲料喂养的新生大鼠的肠道病理形态、屏障功能以及菌群多样性、组成和丰度进行了综合分析,加深了对新生大鼠肠道菌群的理解,探究了孕前和孕期高脂喂养对新生大鼠肠道菌群的影响,结果提示孕前和孕期的高脂饲料喂养,可能导致新生大鼠肠道代谢相关菌和致病菌的丰度增加。本研究存在一定局限性,仅对新生大鼠的肠道菌群进行 16s rRNA 分析,未开展宏基因组测序,后续需要展开深入研究。综上所述,本研究发现孕前和孕期高脂饲料喂养会改变新生大鼠肠道菌群的组成。

**利益冲突声明** 本研究不存在任何利益冲突

#### 参考文献

- [1] De vos WM, Tilg H, Van hul M, et al. Gut microbiome and health: mechanistic insights [J]. Gut, 2022, 71(5): 1020 - 1032.
- [2] Gomaa EZ. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2020, 113(12): 2019 - 2040.
- [3] Enav H, Bäckhed F, Ley RE. The developing infant gut microbiome: A strain - level view [J]. Cell Host & Microbe, 2022, 30(5): 627 - 638.
- [4] Browne HP, Shao Y, Lawley TD. Mother - infant transmission of human microbiota [J]. Current Opinion in Microbiology, 2022, 69: 102173.
- [5] Wang SP, Ryan CA, Boyaval P, et al. Maternal vertical transmission affecting early - life microbiota development [J]. Trends in Microbiology, 2020, 28(1): 28 - 45.
- [6] Adak A, Khan MR. An insight into gut microbiota and its functionalities [J]. CMLS - Cellular and Molecular Life Sciences, 2019, 76(3): 473 - 493.
- [7] Witkowski M, Weeks TL, Hazen SL. Gut microbiota and cardiovascular disease [J]. Circulation Research, 2020, 127(4): 553 - 570.
- [8] Van hul M, Cani PD. The gut microbiota in obesity and weight management: microbes as friends or foe? [J]. Nature Reviews Endocrinology, 2023, 19(5): 258 - 271.
- [9] Sorboni SG, Moghaddam HS, Jafarzadeh - Esfehani R, et al. A comprehensive review on the role of the gut microbiome in human neurological disorders [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2022, 35(1): e0033820.
- [10] 李鑫,关明杰. 肠道菌群与儿童神经系统发育关系的研究进展 [J]. 现代预防医学, 2021, 48(6): 1019 - 1022.  
Li X, Guan MJ. Research progress on the relationship between intestinal microflora and children's nervous system development [J]. Modern Preventive Medicine, 2021, 48(6): 1019 - 1022.
- [11] Ma J, Prince AL, Bader D, et al. High - fat maternal diet during pregnancy persistently alters the offspring microbiome in a Primate model [J]. Nature Communications, 2014, 5: 3889.

- [12] Myles IA, Fontecilla NM, Janelsins BM, et al. Parental dietary fat intake alters offspring microbiome and immunity [J]. *Journal of Immunology*, 2013, 191(6): 3200–3209.
- [13] Bisanz JE, Upadhyay V, Turnbaugh JA, et al. Meta-Analysis reveals reproducible gut microbiome alterations in response to a High-Fat Diet [J]. *Cell Host & Microbe*, 2019, 26(2): 265–272. e4.
- [14] Beam A, Clinger E, Hao L. Effect of Diet and dietary components on the composition of the gut microbiota [J]. *Nutrients*, 2021, 13(8): 2795.
- [15] Jiang KR, Zhang Z, Fullington LA, et al. Dietary patterns and obesity in Chinese adults: a systematic review and Meta-Analysis [J]. *Nutrients*, 2022, 14(22): 4911.
- [16] Chen T, Liu YX, Huang LQ. ImageGP: An easy-to-use data visualization web server for scientific researchers [J]. *iMeta*. 2022, 1(1): e5.
- [17] Chu DM, Antony KM, Ma J, et al. The early infant gut microbiome varies in association with a maternal high-fat diet [J]. *Genome Medicine*, 2016, 8(1): 77.
- [18] Salamon D, Sroka-Oleksiak A, Kapusta P, et al. Characteristics of gut microbiota in adult patients with type 1 and type 2 diabetes based on next-generation sequencing of the 16S rRNA gene fragment [J]. *Polish Archives of Internal Medicine*, 2018, 128(6): 336–343.
- [19] Kasai CK, Sugimoto K, Moritani I, et al. Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing [J]. *BMC Gastroenterology*, 2015, 15: 100.
- [20] Watanabe Y, Nagai F, Morotomi M. Characterization of phascolarctobacterium succinatutens sp. nov., an asaccharolytic, succinate-utilizing bacterium isolated from human feces [J]. *Applied and Environment Microbiology*, 2012, 78(2): 511–518.
- [21] Lecomte V, Kaakoush NO, Maloney CA, et al. Changes in gut microbiota in rats fed a high fat diet correlate with obesity-associated metabolic parameters [J]. *PLOS One*, 2015, 10(5): e0126931.
- [22] Mayengbam S, Lambert JE, Parnell JA, et al. Impact of dietary fiber supplementation on modulating microbiota-host-metabolic axes in obesity [J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2019, 64: 228–236.
- [23] Noble EE, Hsu TM, Jones RB, et al. Early-Life sugar consumption affects the rat microbiome independently of obesity [J]. *Journal of Nutrition*, 2017, 147(1): 20–28.
- [24] Gawlińska K, Gawliński D, Filip M, et al. Relationship of maternal high-fat diet during pregnancy and lactation to offspring health [J]. *Nutrition Reviews*, 2021, 79(6): 709–725.
- [25] Quaglio AEV, Grillo TG, De oliveira ECS, et al. Gut microbiota, inflammatory bowel disease and colorectal cancer [J]. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 2022, 28(30): 4053–4060.
- [26] Kang E, Crouse A, Chevallier L, et al. Enterobacteria and host resistance to infection [J]. *Mammalian Genome*, 2018, 29(7/8): 558–576.
- [27] Horowitz A, Chanez-Paredes SD, Haest X, et al. Paracellular permeability and tight junction regulation in gut health and disease [J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2023, 20(7): 417–432.
- [28] Paone PL, Cani PD. Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners? [J]. *Gut*, 2020, 69(12): 2232–2243.
- [29] Kayama H, Okumura R, Takeda K. Interaction between the microbiota, epithelia, and immune cells in the intestine [J]. *Annual Review of Immunology*, 2020, 38: 23–48.
- [30] Barreto E Barreto L, Rattes IC, da Costa AV, et al. Paneth cells and their multiple functions [J]. *Cell Biology International*, 2022, 46(5): 701–710.

收稿日期:2023-11-13

## (上接第 629 页)

- Gu F, Zhang RH, Li D, et al. Analysis of influencing factors on obesity among adolescents in Zhejiang province [J]. *Chinese Journal of School Health*, 2015, 36(2): 231–235.
- [12] Zhou B, Webster J, Fu LY, et al. Intake of low Sodium salt substitute for 3 years attenuates the increase in blood pressure in a rural population of North China – A randomized controlled trial [J]. *International Journal of Cardiology*, 2016, 215: 377–382.
- [13] 吴西梅, 黄伟雄, 邵义娟, 等. 珠三角地区部门中小学生在午餐营养供给状况评估 [J]. *中国学校卫生*, 2021, 42(2): 207–210, 214.
- Wu XM, Huang WX, Shao YJ, et al. Evaluation of nutritional supply for lunch in primary and secondary school students in the pearl river delta region [J]. *Chinese Journal of School Health*, 2021, 42(2): 207–210, 214.
- [14] 孙卓, 朱元申, 邓泽群, 等. 上海市中小学生学习午餐供应、丢弃、营养评价及满意度现状 [J]. *中国公共卫生*, 2022, 38(6): 657–661.
- Sun Z, Zhu YS, Deng ZQ, et al. Consumption, leftover, nutrition and diners' satisfaction of school lunches among primary and secondary school students in Shanghai [J]. *Chinese Journal of Public Health*, 2022, 38(6): 657–661.
- [15] 冯月明, 张杰, 滕克强, 等. 北京市密云区农村中小学生学习午餐剩饭现状 [J]. *中国校医*, 2021, 35(6): 434–435.
- Feng YM, Zhang J, Teng KQ, et al. The current situation of lunch leftover among rural primary and secondary school students in Miyun district, Beijing [J]. *Chinese Journal of School Doctor*, 2021, 35(6): 434–435.
- [16] 陈东宛, 李永进, 刘秀峰, 等. 北京市顺义区初中学生午餐满意度现状调查 [J]. *首都公共卫生*, 2020, 14(6): 307–310.
- Chen DW, Li YJ, Liu XF, et al. The investigation of lunch satisfaction in Junior middle school students in Shunyi district of Beijing [J]. *Capital Journal of Public Health*, 2020, 14(6): 307–310.
- [17] 许翎婕, 邱付平, 陈智球, 等. 长沙市义务教育学校学生午餐满意度及剩饭现状 [J]. *中国学校卫生*, 2021, 42(2): 198–202.
- Xu LJ, Qiu FP, Chen ZQ, et al. Lunch satisfaction and leftovers among students of Changsha compulsory education schools [J]. *Chinese Journal of School Health*, 2021, 42(2): 198–202.
- [18] 赵栋, 邹艳, 苏丹婷, 等. 浙江省 2021 年中小学生学习午餐剩饭剩菜及影响因素分析 [J]. *中国公共卫生*, 2023, 39(5): 581–585.
- Zhao D, Zou Y, Su DT, et al. Prevalence and influence factors of school lunch food waste among primary and middle school students in Zhejiang province, 2021 [J]. *Chinese Journal of Public Health*, 2023, 39(5): 581–585.

收稿日期:2023-09-07