

纳米塑料-重金属-塑化剂联合暴露对儿童肠道微生物菌群及代谢的影响

豆晴楠¹, 赵丽丽¹, 姬汉轩², 王怡斌¹, 陈婉蓉¹,
孙晓涵¹, 姚国琴¹, 马腾云¹

(1.河南师范大学 生命科学学院,河南 新乡 453007;2.新乡医学院 全过程教学基地,河南 新乡 453003)

摘要:[目的]探究纳米塑料(NPs)、镉(Cd)和邻苯二甲酸二丁酯(DBP)污染对儿童肠道菌群多样性、氨基酸代谢及短链脂肪酸(SCFAs)含量的影响.[方法]利用 16S rRNA 高通量测序技术和高效液相色谱-质谱法 LC-MS/MS 分析 NPs、Cd、DBP 单一污染及纳米塑料聚丙烯(PP)、Cd、DBP 复合污染对儿童肠道细菌群落及肠道微生物代谢产物中短链脂肪酸及氨基酸含量的变化.[结果]高通量检测结果显示,与对照相比,在门属水平上,单一污染的优势菌门属无明显变化,PP+Cd、PP+DBP+Cd 复合污染优势菌门属水平丰富度与多样性显著下降;LC-MS/MS 检测结果显示,在肠道微生物代谢产物中,经 NPs 与 DBP 暴露后,氨基酸含量呈现不同程度的下降,而 Cd、PP+Cd、PP+Cd+DBP 处理后,大多数氨基酸的含量显著增加;同时检测到丁酸、戊酸的含量也发生变化.[结论]与单一污染物处理相比 NPs 相关复合污染物暴露处理后其肠道微生物紊乱程度更强,且不同污染物处理均会影响肠道微生物的氨基酸代谢和 SCFAs 产量.肠道菌群与人体健康密切相关,探究肠道菌群及代谢功能在 NPs、Cd、DBP 影响下的变化,从肠道菌群层面评价 NPs、Cd、DBP 单一暴露和复合暴露污染下的危害和风险具有重要意义.

关键词:纳米塑料;镉;邻苯二甲酸二丁酯;肠道菌群;短链脂肪酸;氨基酸

中图分类号:Q939.9

文献标志码:A

文章编号:1000-2367(2024)01-0033-10

微/纳米塑料(micronanoscale plastics, MNPs)是指尺寸小于 5 mm 的塑料颗粒,主要受到水流、风吹、阳光照射等外部环境的影响被破碎或降解所形成^[1],广泛分布在淡水、海洋、土壤甚至空气中.人体内 MNPs 的摄入途径主要是食物、水和空气,如食用鱼类、双壳类、盐、饮用水、饮料、蜂蜜、蔬菜等.另外,塑料是常用的食品包装材料,其在食品生产、运输和包装过程中与食品接触会释放出塑料颗粒,对人类健康产生严重威胁.最近,在人类血液、肺、肝脏、母乳、胎盘、胎粪和婴儿粪便中均发现了微塑料^[2].GREEN 等^[3]构建了人肠道细胞模型,并使用纳米聚苯乙烯颗粒暴露处理,结果发现纳米塑料会影响细胞活力和诱导细胞凋亡.BROWN 等^[4]发现纳米聚苯乙烯颗粒还会对人肺细胞产生炎症作用.其他研究表明,微塑料口服暴露会导致受体肝脏炎症、神经毒性反应,改变氨基酸和胆汁酸代谢,并改变微生物群组成^[5].

此外,由于 MNPs 比表面积相对较大,经过磨损、风化和氧化后 MNPs 带负电荷,重金属和持久性有机污

收稿日期:2023-06-20;**修回日期:**2023-09-18.

基金项目:国家重点研发计划专项(2018YFD0200200);新乡市科技攻关项目(GG2020006);新乡市重大科技专项(22ZD001).

作者简介(通信作者):赵丽丽(1984-),女,河南新乡人,河南师范大学讲师,博士,研究方向为食品微生物学,E-mail: zhaolili@htu.edu.cn.

引用本文:豆晴楠,赵丽丽,姬汉轩,等.纳米塑料-重金属-塑化剂联合暴露对儿童肠道微生物菌群及代谢的影响[J].河南师范大学学报(自然科学版),2024,52(3):33-42.(Dou Qingnan,Zhao Lili, Ji Hanxuan, et al. Effect of combined exposure of nanoplastics-heavy metal-plasticizer on gut microbiota and metabolism in children[J]. Journal of Henan Normal University(Natural Science Edition), 2024, 52(3): 33-42. DOI: 10.16366/j.cnki.1000-2367.2023.06.20.0003.)

染物容易在 MNPs 表面黏附和积累,然后在环境中迁移并进入人体内^[5-6].镉(cadmium, Cd)是环境中最常见的有毒金属污染物之一,广泛存在于土壤、水生生态系统中,具有环境毒性大、易积累、降解性差等特点.有研究报道,长期低剂量 Cd^{2+} 暴露会导致小鼠脂质沉积和肝功能障碍^[7].此外,LIU 等^[8]发现小鼠暴露于 Cd^{2+} 污染物下会降低小鼠肠道总细菌的丰度及结肠中短链脂肪酸的水平.而 MNPs 对 Cd 的吸附可能会进一步改变其环境行为、归宿、生物利用度和毒性,从环境转移到食物链甚至人体,这可能对生态系统及人类健康造成更严重的破坏.将草鱼暴露在聚苯乙烯纳米塑料和 Cd^{2+} 的复合环境中 96 h 后,相较于单一 Cd^{2+} 处理组来说,纳米微塑料的添加急剧增加了 Cd^{2+} 的毒性,且随着浓度的增加,协同作用随之增强^[9].环境中的微塑料在制造过程中不与聚合物碳链聚合,降解时可能会发生一系列变化,导致一些具有生物毒性的塑料添加剂释放到环境中,形成二次污染物,如邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate, DBP).在生殖能力毒性风险测评中,DBP 被分类为生殖毒性第 3 类有毒化合物^[10].作为增塑剂,DBP 被广泛应用于儿童玩具、医疗器械、营养补充剂和各种包装.最近的一项研究在母体和脐带血清样本中发现了 12 种邻苯二甲酸酯代谢物^[11].研究发现,当小鼠暴露于 DBP 时,盲肠内容物中肠道微生物群的组成和结构在门和属水平上均发生了变化.DBP 暴露可导致肠道菌群失调并扰乱肝脏脂质代谢,导致脂质积累,从而造成肝脏炎症^[12].

越来越多的证据证明,环境污染物可以改变生物体内肠道微生物的生物组成和多样性,肠道菌群参与宿主生理功能的调节,在维持宿主健康、免疫系统的正常发育和活动中有重要作用.由于肠道微生物群失调会引起各种与年龄相关的疾病,生态失调已被视为全球死亡的重要原因之一^[13].我们前期的研究发现,纳米塑料(nanoplastics, NPs)、Cd、DBP 均可影响植物乳杆菌的生长,且质量浓度分别为 100.0、2.5、600.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对菌株生长的影响最大;聚丙烯(polypropylene, PP)与聚乙烯(polyethylene, PE)、聚氯乙烯(polyvinyl chloride, PVC)相比,本文所采用的纳米塑料类型中 PP 对植物乳杆菌的影响更大^[14],因此,本实验选用 PP 为 Cd 和 DBP 的复合污染物.然而,目前的研究大多集中在 MNPs 及其他污染物单一污染的危害,而 MNPs 的复合污染可能会造成更严重的健康影响,并且动物与人体肠道菌群存在差异,国内外大多数研究为复合污染对动物和水生生物的毒性影响,很少有人考虑其对人类健康的影响,因此,有必要研究 MNPs、MNPs 添加剂和重金属复合污染对人体健康造成的共同危害.本文建立了肠道微生物体外培养体系,研究 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 NPs、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的重金属 Cd 和 600.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的塑化剂 DBP 共同暴露时儿童肠道菌群及代谢的变化.微塑料类型主要采用 PP、PE、PVC 等 3 种常见的 NPs 类型.考察在 Cd、DBP 单一暴露污染及 PP、Cd、DBP 复合污染下,儿童肠道细菌群落多样性及氨基酸代谢、短链脂肪酸含量的变化.本研究旨在为 NPs、Cd 和 DBP 对儿童肠道的共同作用提供理论依据,并警示人们 NPs 污染的风险.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与药品

无菌脱纤维绵羊血(南京亚松生物科技有限公司);澄清瘤胃液(艾礼生物科技上海有限公司);树脂厌氧培养瓶(河南美凯生物科技有限公司);100 nm NPs 颗粒(聚丙烯 PP、聚乙烯 PE、聚氯乙烯 PVC)(新乡智宝生物科技有限公司);邻苯二甲酸二丁酯(DBP)标准溶液、Cd 镉标准溶液(北京索莱宝科技有限公司);正丁酸、正戊酸标准溶液、乙腈、甲酸(上海麦克林生化科技有限公司).

1.1.2 仪器

安捷伦 1260 液相色谱仪(美国,安捷伦)与三重四极杆飞行时间质谱仪(德国,布鲁克);低温高速离心机 Heraeus Fresco 21(赛默飞世尔科技中国有限公司);全自动氮吹仪(宁波新艺超声设备有限公司);涡旋仪 MI01002(美国 FOUR E'S-广西王河科技有限公司).

1.2 实验方法

1.2.1 样品采集及处理

样品来源于 15 名(8 男 7 女)10 岁以下健康供体的新鲜粪便,均无任何消化性疾病,在样品采集前一周之内未服用过任何药物.排便后立即用无菌袋收集,置于冰袋上 30 min 内送至实验室并充氮气后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下

短暂保存.参考向情儒等^[15]的方法处理样品,并略加修改.从 15 份样品中分别取 0.5 g 混合均匀,按照 1 : 10 的体积比重悬于 PBS 缓冲液中,用涡旋仪充分混合 5 min 后使用 3 层无菌医用纱布过滤,得到 10% 的粪便接种物,置于 4 °C 冰箱备用.

1.2.2 体外培养

体外培养使用树脂厌氧培养瓶,实验共分为 8 种不同处理,分别为 PP、PE、PVC 纳米塑料,Cd、DBP 单一污染,PP+Cd、PP+DBP、PP+Cd+DBP 复合污染,在培养瓶中加入 5 mL 无菌脱纤维绵羊血,5 mL 澄清瘤胃液,0.5 mL 粪便接种物以及不同处理的污染物,其中 NPs、Cd、DBP 的终质量浓度分别为 100.0、2.5、600.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.相同条件下,不加任何污染物的处理为空白对照,每组 3 个重复.将处理后的培养瓶置于 37 °C 下培养 48 h 后收集样品,以供下一步分析.

1.2.3 16S rRNA 高通量测序

样品总 DNA 提取和高通量测序委托上海美吉生物医药科技有限公司进行.取 1 mL 培养好的样品离心 10 min(4 °C,6 000 r/min)取上清于离心管中并使用液氮速冻,将处理合格的样品保存于干冰中至公司进行总 DNA 提取,使用 338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和 806R(5'-GGACTACHVGGGT-WTCTAAT-3')细菌通用引物对 16S rRNA 基因 V3-V4 可变区进行 PCR 扩增.使用质量分数 2% 琼脂糖凝胶回收 PCR 产物,利用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit(Axygen Biosciences, Union City, CA, USA)进行回收产物纯化,2%(质量分数)琼脂糖凝胶电泳检测,并用 Quantus Fluorometer(Promega, USA)对回收产物进行检测定量.使用 NEXTFLEX Rapid DNA-Seq Kit 对纯化后的 PCR 产物进行建库,利用 Illumina 公司平台进行测序(上海美吉生物医药科技有限公司).

1.2.4 短链脂肪酸的测定

取 1 mL 培养好的样品离心 10 min(4 °C,13 000 r/min)取上清于离心管中并用 0.22 μm 滤膜过滤至进样瓶待测.设定丙酸、丁酸、戊酸质量浓度为 0、5、10、25、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{L}$,使用高效液相色谱-质谱联用技术制作出标准曲线,通过 DataAnalysis 软件分析数据并记录峰面积,采用线性回归分析法计算不同处理对肠道细菌产物短链脂肪酸含量的影响.色谱条件:色谱柱为 XDB-C18 液相色谱柱,使用梯度洗脱的方法.流动相:A(含体积分数 0.1% 甲酸的水);B(含体积分数 0.1% 甲酸的乙腈),其中进样量为 10 μL ,柱温为 30 °C.流动相洗脱梯度见表 S1.质谱条件:采用电喷雾离子源,MRM 的正离子模式,氮气作为雾化、锥孔气^[16];主要参数设置包括:毛细管电压 4.5 kV;端板偏移电压 0.5 kV;离子源温度 220 °C;喷雾器电压 5.0 kV;干燥气体条件 9.0 L/min;质荷比范围 50~1 300 m/z.

1.2.5 氨基酸代谢产物的测定

按照 1.2.4 中的方法进行样品处理及检测,根据不同种类氨基酸的分子式与相对分子质量与样品特征峰比对,以确定氨基酸种类并利用特征峰面积计算氨基酸含量(附录图 S1).

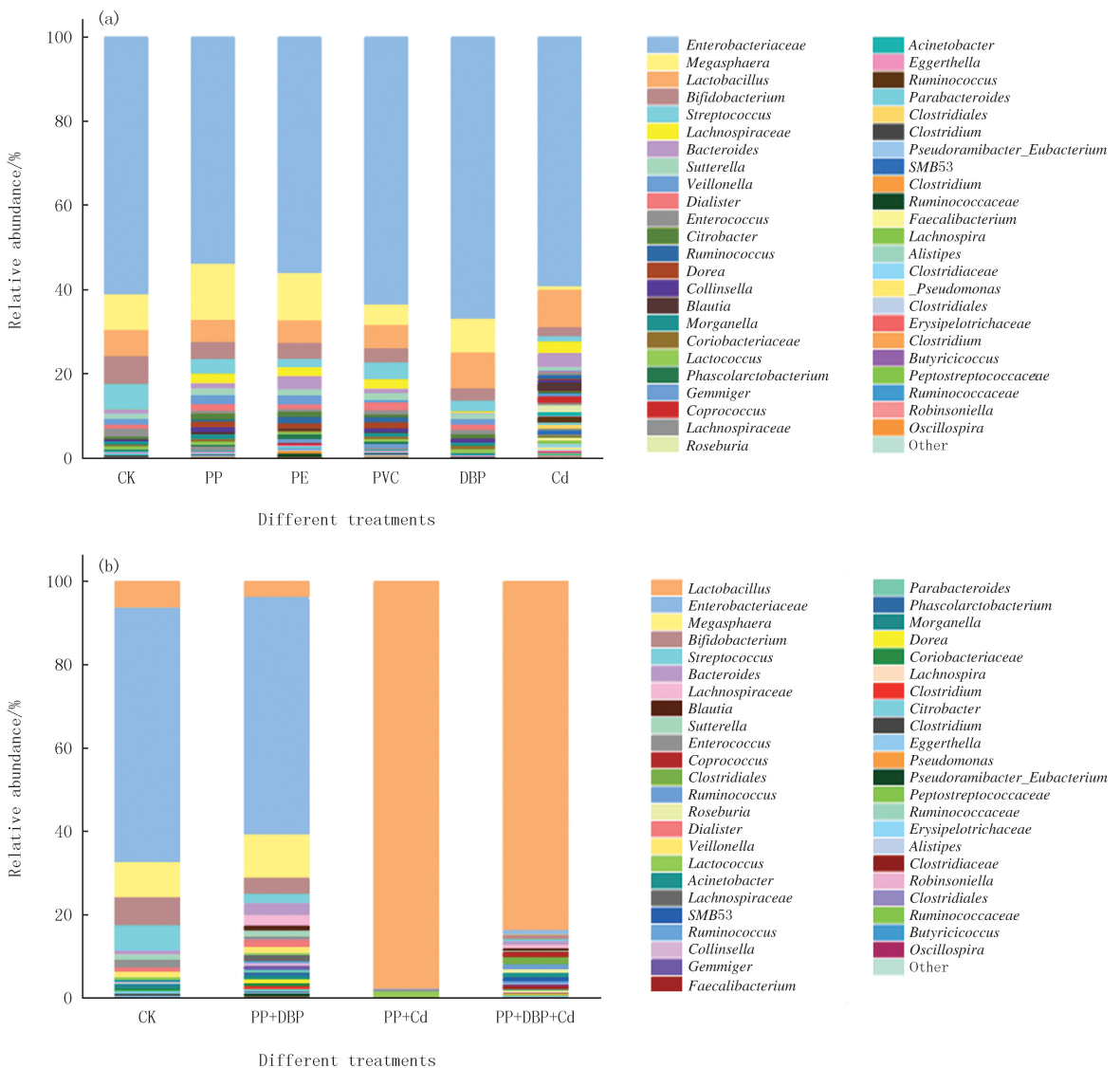
1.2.6 方法验证与数据分析

从线性、检出限(LOD)两方面评估液相色谱质谱法测定氨基酸代谢产物、短链脂肪酸含量的准确性.分别绘制不同氨基酸和短链脂肪酸浓度下的峰面积(Y)与浓度(X)之间的关系,氨基酸和短链脂肪酸在各自的质量浓度范围内均有良好的线性关系,最低检测限(LOD)以 3 倍信噪比计算.不同氨基酸的线性相关系数为 0.997 0~0.999 1,检出限为 3.12~11.40 ng/L;短链脂肪酸的线性相关系数为 0.999 0~0.999 3,检出限为 0.8~1.0 ng/L,表明该方法具有较高的灵敏度.使用 Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2(QIIME 2)分析得到的序列数据,DADA 2 对序列进行质量过滤、修剪、去噪和合并,并用 GreenGenes(版本 13.8)参考数据库进行分类分析,R 语言进行数据清洗和检验;利用 Excel 进行实验数据整理,数据结果以平均值 \pm 标准差表示($n=3$),利用 SPSS 21.0 软件,单因素分析方法(ANOVA)进行显著性分析, $P<0.05$ 表示有统计学意义;氨基酸代谢产物、短链脂肪酸含量数据处理及作图采用 Origin 2018;冗余分析利用 Canoco 进行,使用 Canoco for Windows 指定分析的数据和排序模型,CanoDraw 绘制排序图;利用 R 语言生成物种相关性矩阵,相关性 $|r|>0.6$ 、 $p<0.05$ 挑选物种进行相关性网络图分析^[17],网络图绘制使用 Gephi 软件.

2 结 果

2.1 不同污染对儿童肠道菌群门属水平的影响

不同污染物暴露下儿童肠道菌群门水平变化情况见附录图 S1, 每个处理组 3 个重复. 儿童肠道微生物菌群在门分类水平上共鉴定出 9 个门, 其中优势菌门为变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes), 占总比例的 99%~100%. 与对照相比经不同类型的 NPs、DBP、Cd 单一污染及 PP+DBP 复合污染后, Proteobacteria、Firmicutes、Actinobacteria 丰度无明显变化, 门水平细菌群落组成无显著性差异; 经 PP+Cd、PP+DBP+Cd 联合暴露后厚壁菌门的相对丰度分别升高至 99.83% 和 94.96%, 门水平多样性明显降低. 不同污染物暴露下儿童肠道菌群属水平变化情况如图 1 所示.



(a) 单一污染处理对儿童肠道菌群属水平的影响; (b) 复合污染处理对儿童肠道菌群属水平的影响.

图1 不同污染处理对儿童肠道菌群属水平的影响

Fig.1 Effect of different contamination treatments on the genus level of intestinal flora in children

图 1(a) 和图 1(b) 均选择样本中相对丰度大于 0.05% 的前 47 和 46 个属, 与对照相比, 单一污染及 PP+DBP 复合污染的优势菌属无明显变化, 主要为肠杆菌科(Enterobacteriaceae)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、巨型球菌属(*Megasphaera*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、链球菌属(*Streptococcus*), 其中 *Bifidobacteri-*

um, *Streptococcus* 丰度下降。菌属多样性增加,新增多尔氏菌属(*Dorea*)、布劳特氏菌属(*Blautia*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)等。与单一污染相比,在 PP+Cd 和 PP+DBP+Cd 复合污染组中优势菌属有显著差异,其中乳杆菌属的相对丰度分别升高至 97.50% 和 83.45%,PP+Cd 样品属水平多样性显著下降。以上结果表明,在不同污染物暴露下均会使肠道菌群发生一定程度的紊乱,其中 PP+Cd 和 PP+DBP+Cd 复合污染暴露下的菌群紊乱程度最强,且乳杆菌属对这 2 组样品污染物耐受性最强。

2.2 不同污染与儿童肠道菌群相关性分析

为了了解环境变量 NPs, Cd 和 DBP 不同污染方式与儿童肠道菌群物种分类水平间的变化(每个处理 3 个重复),运用 Canoco 进行相关性分析(图 2),数据分析的 4 个轴的最大梯度为 2.369,因此进一步分析采用基于线性模型的 RDA 直接排序法。

选取了相对丰度大于 0.005% 的前 44 个菌属, Cd 与乳球菌属(*Lactococcus*)、*Lactobacillus*、萨特氏菌属(*Sutterella*)、小杆菌属(*Dialister*)、Enterobacteriaceae、摩根氏菌属(*Morganella*)、柯林斯菌属(*Collinsella*)呈正相关,与拟杆菌属(*Bacteroides*)、消化链球菌科(Peptostreptococcaceae)、副拟杆菌属(*Parabacteroides*)等呈负相关;PVC 与 Cd 呈现相反的趋势;PP、PP+Cd 与梭菌属(*Clostridium*)、*Ruminococcus*、考拉杆菌属(*Phascolarctobacterium*)、*Parabacteroides*等呈正相关;DBP、PP+DBP、PP+DBP+Cd 与梭菌目(*Clostridiales*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、*Streptococcus*、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、芽殖菌属(*Gemmiger*)等呈正相关,与布劳特氏菌属(*Blautia*)、韦荣氏球菌属(*Veillonella*)、巨型球菌属(*Megasphaera*)、毛螺菌科(Lachnospiraceae)等呈负相关;PE 与 DBP、PP+DBP、PP+DBP+Cd 呈相反的趋势。

2.3 不同污染对儿童肠道细菌群落影响的网络分析

探索纳米塑料、重金属、塑化剂与儿童肠道细菌类群之间的关联,图 3(a)和图 3(b)分别显示了单一污染(PP、PE、PVC、Cd、DBP 处理组)和复合污染(PP+Cd、PP+DBP、PP+Cd+DBP 处理组)下微生物之间的相互关系,每个处理组 3 个重复。由图 3 可以看出,单一污染和复合污染中细菌网络第一优势菌门均是厚壁菌门,分别为 85.29% 和 84.38%;图 3(a,b)均以正相关关系为主,正相关比例分别为 77.65% 和 90.91%。通过计算分子生态网络拓扑学特征参数描述菌群之间复杂的相互关系,图 3(a)中节点数为 34,连接数为 85,其中粪球菌属连通数最高(7),与其他节点多为负相关关系;图 3(b)中节点数为 32,连接数为 88,*Lactobacillus*、*Parabacteroides*、*Phascolarctobacterium*、*Megasphaera*、*Veillonella*、*Collinsella*、*Bacteroides*、*Sutterella*、*Clostridium* 的连接数最高(均为 8),除 *Lactobacillus* 外与周围节点均为正相关关系;并且这 9 个节点之间相互作用,*Lactobacillus* 与其他 8 个节点以竞争关系互动;与图 3(a)相比,图 3(b)的边数、平均度、平均聚类系数、连接部件和图密度均较高,模块化指数和网络直径较低,但两者模块化指数大于 0.4,说明网络均具有模块化结构。

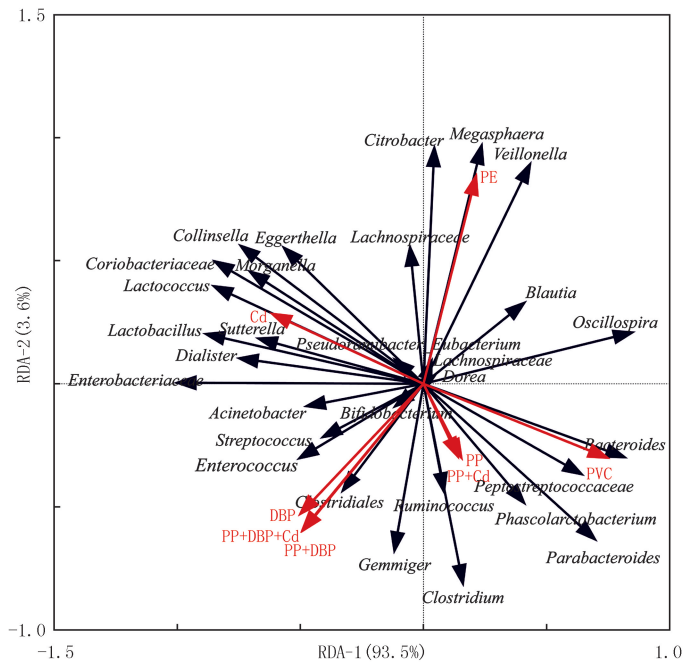


图2 微塑料污染与儿童肠道菌群的冗余分析(RDA)

Fig. 2 Analysis of redundancy(RDA) of microplastic pollution and childhood gut microbiota

两组细菌网络第一优势菌门均是 Firmicutes, 分别为 85.29% 和 84.38%, 由此说明, 单一污染物细菌分子生态网络中物种更丰富、互作关系更复杂; 复合污染中 *Collinsella*, *Clostridium*, *Megasphaera*, *Collinsella* 等致病菌在复合污染中以共生关系与周围细菌互作; *Lactobacillus* 与周围节点均为负相关关系(100%), 说明 *Lactobacillus* 多以竞争关系与周围细菌互作. 本研究构建的两个分子生态网络中均为正相关关系占优势(77.65%、90.91%), 表明合作关系大于竞争关系.

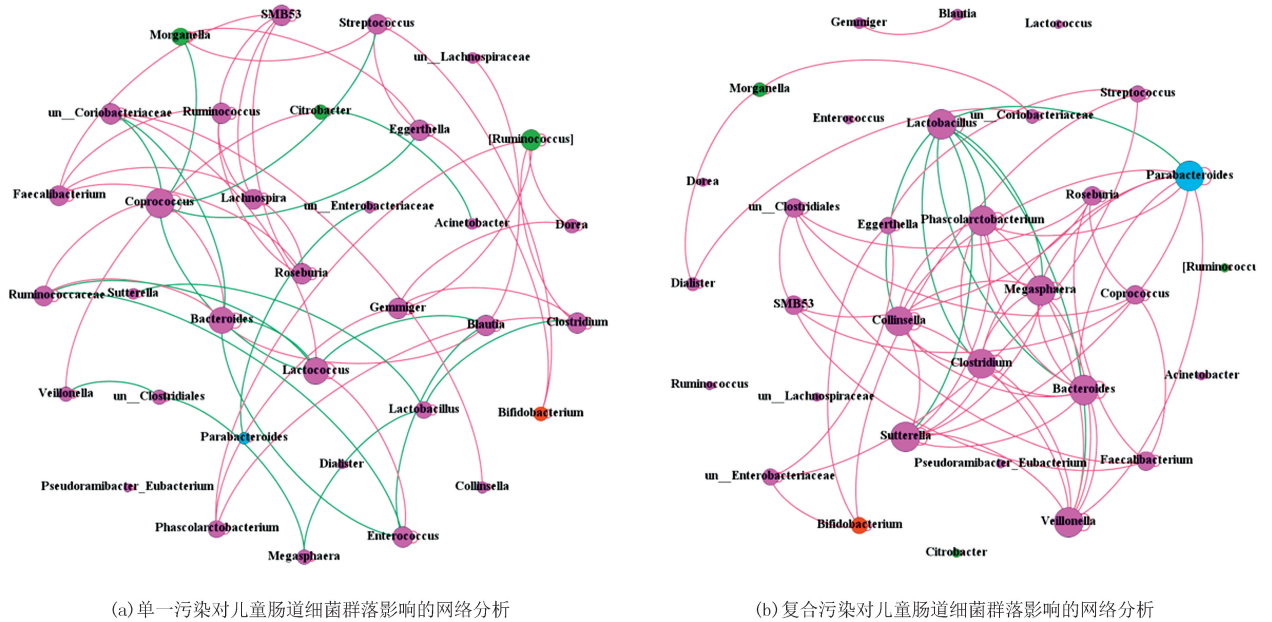


图3 不同处理对儿童肠道细菌群落影响的网络分析

Fig. 3 Network analysis of the effects of different treatments on gut bacterial communities in children

2.4 不同污染处理对儿童肠道代谢的影响

2.4.1 对肠道微生物氨基酸代谢的影响

使用 LC-MS/MS 测定肠道微生物培养系统中 19 种氨基酸的含量, 并将测定结果导入 Origin, 数据经 Z 评分进行归一化处理后绘制热图, 用来表达不同污染物单一处理及复合污染等 8 种不同处理方式对肠道微生物氨基酸代谢的影响, 每个处理组 3 个重复. 如图 4(a) 所示, 与对照组相比, 经 NPs 与 DBP 单一暴露后, 除甘氨酸、缬氨酸和苏氨酸外, 其他氨基酸含量均有不同程度的下降, 其中亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸和丙氨酸下降最明显; Cd 单一暴露、PP+Cd、PP+Cd+DBP 复合暴露后, 大多数氨基酸的含量显著增加. 由此说明, 不同污染物处理均会影响氨基酸代谢.

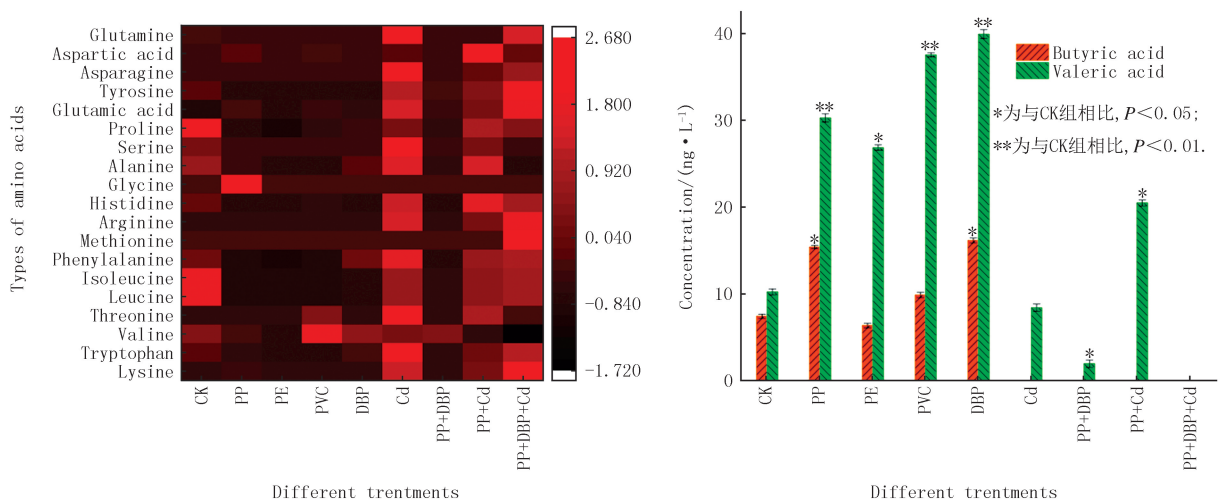
2.4.2 对儿童肠道菌群代谢产物短链脂肪酸的影响

如图 4(b) 所示, 研究了不同污染对儿童肠道菌群代谢产物 SCFAs 的影响, 鉴定了肠道微生物培养体系中丁酸和戊酸的含量(每个处理组 3 个重复). 与对照组相比, 肠道微生物产生丁酸的量在 PP、PVC、DBP 暴露下有所升高, 而在 PE 处理下含量基本不变. 在 Cd、PP+DBP、PP+Cd、PP+DBP+Cd 等 4 个处理组中, 丁酸含量均为 0. 在 PP、PE、PVC、DBP 和 PP+Cd 组中, 戊酸的含量大幅度增加, 与对照相比有极显著性差异; 而 Cd、PP+DBP、PP+DBP+Cd 组的戊酸含量降低. 以上述结果可知, 添加纳米塑料、重金属、塑化剂后对肠道微生物代谢产物 SCFAs 的含量均有一定程度的影响.

3 讨论

肠道菌群是生物体内一个非常重要的微生态系统, 主要依靠宿主生物的肠道生存并发挥相应的功能. 人体微生物群落组成和多样性与人体健康密切相关. 本项研究中利用高通量测序和液相质谱联用分析了纳米塑料、重金属和塑化剂在单一污染和复合污染时对儿童肠道细菌群落组成、分子生态网络的拓扑学特征、氨基酸和短链脂肪酸产物的影响, 是研究儿童微生物群落结构及其代谢功能响应的关键. 研究结果表明, 经不

同污染物暴露后,儿童肠道菌群发生紊乱的程度也具有差异性.与 PP+Cd、PP+Cd+DBP 复合污染相比,单一污染的门属水平变化较小,可能是因为复合污染时微塑料会将 Cd^{2+} 吸附在表面,共同作用于人体,对肠道菌群造成更严重的危害,其中 NPs-PP 与 Cd 联合暴露后,肠道菌群门水平数量显著减少,Firmicutes 相对丰度增加,这与 JIN 等^[18]在 NPs 对斑马鱼肠道菌群影响的研究结果一致.Firmicutes 和 Bacteroidetes 是肠道微生物群中的 2 种主要细菌,病理学上,Firmicutes 可诱导肥胖和脂肪肝变性,并促进 TNF- α mRNA 水平的升高,Firmicutes 可能参与了非酒精性脂肪性肝病的发病机制,并且胆石病患者、多发性硬化症患者^[19]Firmicutes 的数量均显著增加.Firmicutes 与 Bacteroidetes 的比值(F/B)与炎症状况密切相关,如炎症性肠病(IBD)和肥胖个体都存在较高的比值.本实验中,与对照相比 PP、PVC、DBP、PP+Cd、PP+Cd+DBP 实验组的 F/B 增加,从 20.8 分别增加至 25.5、21.0、82.6、1 836.3、91.6;LOUIS 等^[20]为 16 名肥胖患者实施了一项减肥计划,结果显示肥胖患者的 F/B 比率高于健康组.然而与 PP+Cd 相比,PP+Cd+DBP 复合污染时 Firmicutes 丰度相对略有降低,Bacteroidetes 丰度及门水平数有所回升,可能是因为 DBP 与 Cd 共同存在下呈现出拮抗作用.



(a) 不同污染对氨基酸代谢的热图分析

(b) 不同污染后粪便中短链脂肪酸的含量

图4 不同污染处理对儿童肠道代谢的影响

Fig.4 Effects of different contamination treatments on intestinal metabolism in children

在属水平上,经污染物暴露后 *Bifidobacterium*、链球菌属(*Streptococcus*)相对丰度降低。*Bifidobacterium* 丰度降低会使小鼠体重增加、脂肪堆积并降低葡萄糖耐量,引起代谢紊乱^[21],这些益生菌丰度的下降会破坏肠道微生态平衡,降低肠道免疫能力及健康程度.另外,不同污染物暴露后新增多尔氏菌属(*Dorea*)、*Blautia*、*Ruminococcus*、粪杆菌属(*Faecalibacterium*)、罗氏菌属(*Roseburia*),其丰度均与慢性疾病包括炎症性肠病、结肠癌、肥胖等密切相关^[22].有实验研究了不同胃肠道疾病患者肠道菌群的变化,其中肠易激综合征会导致 *Faecalibacterium* 丰度升高,溃疡性结肠炎会使 *Blautia*、*Roseburia* 丰度升高,克罗恩病会使 *Ruminococcus* 丰度升高^[23].PP+Cd、PP+DBP+Cd 复合污染时,菌群多样性降低,优势菌群由 *Enterobacteriaceae* 变为 *Lactobacillus*,*Lactobacillus* 相对丰度增高至 97.50%和 83.45%.ZHAI 等^[24]研究表明乳酸菌对重金属镉具有强的耐受能力,且在二价金属 Cd 离子存在下,会促使细胞表面分泌物增多,细胞发生聚集形成生物膜.段莉阳等^[25]的研究表明,在重金属和微塑料等胁迫条件下,具有相应耐受能力的微生物会与微塑料黏附,并得以富集生长.所以本实验中,*Lactobacillus* 丰度升高可能是由于 PP+Cd、PP+Cd+DBP 共同污染时,*Lactobacillus* 为抵御不良环境,与 PP 发生黏附,使细胞聚集形成生物膜,造成丰度升高,说明乳酸菌有较强的耐受性.总之,不同的污染物暴露下都会导致细菌群落在门属水平上的多样性和丰富度呈现明显差异,并且与单一污染相比复合污染的差异性更强,因此,肠道菌群对于维持宿主的健康非常重要.

网络分析与肠道菌群的多样性分析相比,网络分析更便于体现微生物之间的相互作用以及结构变化.在

分子生态网络图中,正相关通常代表生态位一致性或共生关系,负相关代表竞争关系.在整个网络中,复合污染时 *Lactobacillus* 以竞争关系与周围细菌互动,*Lactobacillus* 丰度的增加使肠道菌群多样性降低.本研究构建的两个分子生态网络中均为正相关关系占优势,表明整体上合作关系大于竞争关系,但复合污染更能促进微生物之间的共生关系.同时,与单一污染相比,复合污染具有较短的平均路径长度(1)和较高的平均聚类系数(0.928).平均路径长度表示物质、信息、能量在微生物之间的传递效率,平均聚类系数表示节点与其他节点的连接程度^[26].由此说明,复合污染下微生物之间的关系更密切,网络图中节点之间的响应速度和传递效率更高,群落结构更易发生变化.复合污染的连接数和平均度均较高,说明复合污染下细菌分子生态网络中物种互作关系更复杂;单一污染的节点数较高,说明单一污染下物种更丰富.

肠道微生物群在氨基酸消化和吸收过程中起着至关重要的作用,氨基酸代谢的多样性可能会对宿主产生有益或不利的影 响.*Clostridium*、*Bacteroides*、*Bifidobacterium* 丰度与氨基酸代谢能力密切相关,而复合污染时它们的丰度降低,使氨基酸的分解与利用率下降,在人体肠道大量积累.研究表明,克罗恩病患者粪便中高水平的氨基酸,如丙氨酸、 β -丙氨酸和苯丙氨酸,部分原因可能是这些患者的炎症引起的吸收不良,或反映了产生细菌的增加^[27].微生物群衍生分子(如 SCFAs)作为微生物群和宿主之间的重要分子信号或调节宿主代谢的代谢底物^[28].复合污染时,氨基酸代谢产物丙酸、丁酸含量为 0,丁酸作为肠道上皮细胞线粒体呼吸的主要能量来源,在组蛋白去乙酰化过程中起到重要作用,广泛影响肠道上皮细胞和免疫细胞的繁殖和代谢^[29].戊酸含量大幅上升,可能是因为 *Lactobacillus*、*Ruminococcus* 丰度的升高.丁酸对糖尿病有较大的有益作用,并在构建肠道粘膜结构和肠道免疫屏障中起重要作用^[30].NPs 暴露会降低肠道中双歧杆菌的丰度,并显著降低肠道菌群中双歧杆菌/大肠杆菌(B/E)值,其中 PP+Cd 的 B/E 值为 0,肠道定植能力明显减弱,影响肠道微生物的代谢功能,降低短链脂肪酸的含量.另外,由于本实验是将人体粪便细菌进行体外培养和暴露,缺少了肠道内环境的相互作用.所以,目前的结果对污染物人体健康效应的意义有限,没有办法直接外推至人体.关于 NPs、Cd、DBP 单一污染和复合污染对儿童肠道微生物群落结构的改变还需要更多的毒理学实验进一步研究.

4 结 论

本实验研究了 NPs(PP、PE、PVC)、Cd、DBP 单一污染和复合污染对儿童肠道细菌群落、短链脂肪酸含量和氨基酸代谢能力的影响.实验结果显示,一方面,在肠道菌群多样性分析上,不同处理均会使肠道菌群发生不同程度的紊乱,细菌群落的多样性和丰富度都呈现明显差异,且复合污染时差异更明显.单一污染时优势菌门为 Proteobacteria、Firmicutes、Actinobacteria、Bacteroidetes,优势菌属主要为 Enterobacteriaceae、*Lactobacillus*、*Megasphaera*、*Bifidobacterium*.而 PP+Cd、PP+DBP+Cd 复合污染时 Firmicutes 占比较大,乳杆菌显示出对污染物更强的耐受性.同时,在肠道菌群相互关系上,复合污染时也比单一污染时微生物互作关系更复杂.另一方面,在肠道微生物代谢分析上,纳米塑料与重金属、塑化剂复合污染时会影响氨基酸的代谢及短链脂肪酸的合成,氨基酸比例失衡使肠道黏膜受损,短链脂肪酸合成能力下降会影响营养物质的吸收及免疫防御能力,危害人体健康.

附录见电子版(DOI:10.16366/j.cnki.1000-2367.2023.06.20.0003).

参 考 文 献

- [1] GALGANI F, HANKE G, WERNER S, et al. Marine litter within the European marine strategy framework directive[J]. ICES Journal of Marine Science, 2013, 70(6): 1055-1064.
- [2] DAMIA B, YOLANDA P, AHMED H, Alfarhan, Microplastics: Detection in human samples, cell line studies, and health impacts[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2023, 101: 104204.
- [3] GREEN T R, FISHER J, STONE M, et al. Polyethylene particles of a 'critical size' are necessary for the induction of cytokines by macrophages in vitro[J]. Biomaterials, 1998, 19(24): 2297-2302.
- [4] BROWN D M, WILSON M R, MACNEE W, et al. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2001, 175(3): 191-199.

- [5] JIN Y X, LU L, TU W Q, et al. Impacts of polystyrene microplastic on the gut barrier, microbiota and metabolism of mice[J]. *The Science of the Total Environment*, 2019, 649: 308-317.
- [6] WANG F Y, YANG W W, CHENG P, et al. Adsorption characteristics of cadmium onto microplastics from aqueous solutions[J]. *Chemosphere*, 2019, 235: 1073-1080.
- [7] ZHANG S B, JIN Y X, ZENG Z Y, et al. Subchronic exposure of mice to cadmium perturbs their hepatic energy metabolism and gut microbiome[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2015, 28(10): 2000-2009.
- [8] LIU Y H, LI Y H, LIU K Y, et al. Exposing to cadmium stress cause profound toxic effect on microbiota of the mice intestinal tract[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e85323.
- [9] CHEN X, WANG J, XIE Y J, et al. Physiological response and oxidative stress of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) under single and combined toxicity of polystyrene microplastics and cadmium[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 245: 114080.
- [10] CAMPANALE C, MASSARELLI C, SAVINO I, et al. A Detailed Review Study on Potential Effects of Microplastics and Additives of Concern on Human Health[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2020, 17(4): 1212.
- [11] HWA H L, PENG F S, TING T T, et al. Monitoring phthalates in maternal and cord blood: implications for prenatal exposure and birth outcomes[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2022, 41(3): 715-725.
- [12] XIONG Z, ZENG Y Y, ZHOU J F, et al. Exposure to dibutyl phthalate impairs lipid metabolism and causes inflammation via disturbing microbiota-related gut-liver axis[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2020, 52(12): 1382-1393.
- [13] ROTH G A, ABATE D, ABATE K H, et al. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. *Lancet*, 2018, 392(10159): 1736-1788.
- [14] ZHAO L L, DOU Q N, CHEN S Y, et al. Adsorption abilities and mechanisms of *Lactobacillus* on various microplastics[J]. *Chemosphere*, 2023, 320: 138038.
- [15] 向情儒, 李文远, 冯涛. 基于体外发酵的双孢菇膳食纤维及双孢菇粉对人体肠道菌群的调节作用[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(10): 130-137.
- XIANG Q R, LI W Y, FENG T. Regulating effects of dietary fiber and powder of *Agaricus bisporus* based on in vitro fermentation on human gut microbiota[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(10): 130-137.
- [16] 符欢. 人粪便中短链脂肪酸的快速分析方法建立和验证及其临床应用[D]. 长春: 长春工业大学, 2020.
- FU H. Establishment and validation of rapid analysis methods of short-chain fatty acids in human feces and their clinical application[D]. Changchun: Changchun University of Technology, 2020.
- [17] BARBERÁN A, BATES S T, CASAMAYOR E O, et al. Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(2): 343-351.
- [18] JIN Y X, XIA J Z, PAN Z H, et al. Polystyrene microplastics induce microbiota dysbiosis and inflammation in the gut of adult zebrafish [J]. *Environmental Pollution*, 2018, 235: 322-329.
- [19] COSORICH I, DALLA-COSTA G, SORINI C, et al. High frequency of intestinal TH17 cells correlates with microbiota alterations and disease activity in multiple sclerosis[J]. *Science Advances*, 2017, 3(7): e1700492.
- [20] LOUIS S, TAPPU R M, DAMMS-MACHADO A, et al. Characterization of the gut microbial community of obese patients following a weight-loss intervention using whole metagenome shotgun sequencing[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0149564.
- [21] WOTING A N, PFEIFFER N, HANSKE L, et al. Alleviation of high fat diet-induced obesity by oligofructose in gnotobiotic mice is independent of presence of *Bifidobacterium longum*[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2015, 59(11): 2267-2278.
- [22] WANG X Q, ZHANG A H, MIAO J H, et al. Gut microbiota as important modulator of metabolism in health and disease[J]. *RSC Advances*, 2018, 8(74): 42380-42389.
- [23] NISHINO K, NISHIDA A, INOUE R, et al. Analysis of endoscopic brush samples identified mucosa-associated dysbiosis in inflammatory bowel disease[J]. *Journal of Gastroenterology*, 2018, 53(1): 95-106.
- [24] ZHAI Q X, YIN R J, YU L L, et al. Screening of lactic acid bacteria with potential protective effects against cadmium toxicity[J]. *Food Control*, 2015, 54: 23-30.
- [25] 段莉阳, 张玉, 任学敏, 等. 微塑料和镉复合污染对狼尾草根际土壤微生物群落结构和功能的影响[J]. *环境科学*, 2023, 44(12): 6973-6981.
- DUAN L Y, ZHANG Y, REN X M, et al. Effect of microplastic and cadmium compound contamination on microbial community structure and function in the rhizosphere of plants[J]. *Environmental Science*, 2023, 44(12): 6973-6981.
- [26] DENG Y, ZHANG P, QIN Y, et al. Network succession reveals the importance of competition in response to emulsified vegetable oil amendment for uranium bioremediation[J]. *Environ Microbiol*, 2016, 18(1): 205-218.
- [27] SANTORU M L, PIRAS C, MURGIA A, et al. Cross sectional evaluation of the gut-microbiome metabolome axis in an Italian cohort of IBD patients[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 9523.
- [28] 张小芳. 利用体外发酵模型研究人体肠道中氨基酸代谢[D]. 金华: 浙江师范大学, 2020.

- [29] 庞博.发芽糙米对 T2DM 患者支链氨基酸和短链脂肪酸的影响研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2019.
PANG B.Effect of germinated brown rice on branched chain amino acids and short chain fatty acids in T2DM patients[D].Harbin:Harbin Institute of Technology,2019.
- [30] MORRISON D J,PRESTON T.Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism[J].Gut Microbes,2016,7(3):189-200.

Effect of combined exposure of nanoplastics-heavy metal-plasticizer on gut microbiota and metabolism in children

Dou Qingnan¹, Zhao Lili¹, Ji Hanxuan², Wang Yibin¹, Chen Wanrong¹,
Sun Xiaohan¹, Yao Guoqin¹, Ma Tengyun¹

(1. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China; 2. Whole-process Teaching Base, Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, China)

Abstract: [Objective] To explore the effects of nano-plastics(NPs), cadmium(Cd) and dibutyl phthalate(DBP) on intestinal flora diversity, amino acid metabolism and short-chain fatty acid content in children. [Methods] The effects of single and combined pollution of nano-plastics(polypropylene,PP), Cd and DBP on the contents of short-chain fatty acids and amino acids in intestinal bacterial communities and intestinal microbial metabolites in children were analyzed by high throughput sequencing technology of 16S rRNA and high performance liquid chromatogen-mass spectrometry(LC-MS/MS). [Results] The high-throughput test results showed that, compared with the control, at the phylum genus level, the dominant bacteria with single pollution had no significant change, and the diversity of the dominant bacteria with PP+Cd, PP+DBP+Cd combined pollution significantly decreased. The results of LC-MS/MS test showed that the amino acid content of intestinal microbial metabolites decreased to varying degrees after exposure to NPs and DBP, while the content of most amino acids increased significantly after Cd, PP+Cd, PP+Cd+DBP treatment. The content of butyric acid and valerate also changed. [Conclusion] Compared with the single pollutant treatment, the intestinal microbial disorder is stronger after exposure to nano-plastics-related complex pollutants, and different pollutant treatments could affect the amino acid metabolism and SCFAs production of intestinal microorganisms. Intestinal flora is closely related to human health. It is of great significance to explore the changes of intestinal flora and metabolic function under the influence of NPs, Cd and DBP, and to evaluate the hazards and risks of single exposure and combined exposure to NPs, Cd and DBP from the level of intestinal flora.

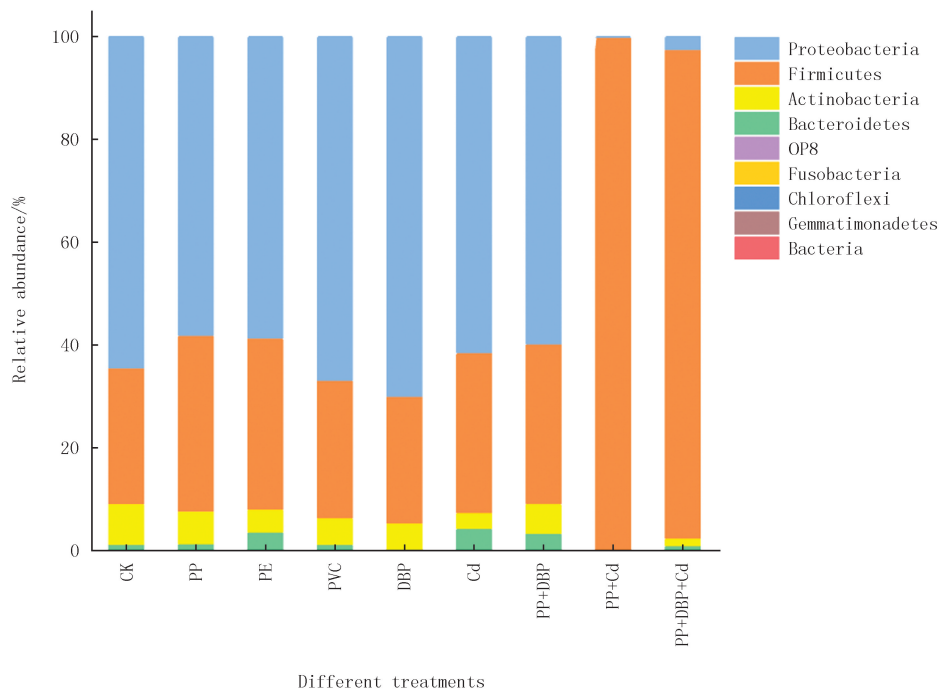
Keywords: nano-plastics; cadmium; dibutyl phthalate; gut microbiota; short-chain fatty acids; amino acid

[责任编辑 刘洋 杨浦]

表 S1 流动相洗脱梯度

Tab. S1 Gradient elution program of mobile phase

t/min	A/%	B/%	Flow rate/($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)
0	95	5	0.3
0.5	95	5	0.3
4	80	20	0.3
8	0	100	0.3
9	0	100	0.3
9.5	95	5	0.3
12	95	5	0.3



图S1 不同污染处理对儿童肠道菌群门水平的影响

Fig.S1 Effect of different contamination treatments on the level of intestinal flora in children