

一种蛹虫草固体饮料对小鼠肠道菌群的影响

贾俊杰, 颜迟, 邵颖*, 陈安徽, 刘辉 (江苏省食品资源开发与质量安全重点建设实验室, 徐州工程学院, 江苏徐州 221008)

摘要 [目的]研究蛹虫草速溶粉(佑元茶)对小鼠肠道菌群的影响。[方法]利用抗生素(青霉素钠)构建肠道菌群失调小鼠模型,以正常小鼠为对照,采用菌落计数法考察一种蛹虫草固体饮料对肠道菌群失调小鼠的肠道修复作用。[结果]蛹虫草固体饮料的高、中剂量组小鼠的体重显著高于其他组($P<0.05$)。高、中、低3个剂量组小鼠肠道中的益生菌乳酸杆菌和双歧杆菌数量均显著高于模型组,且条件致病菌肠球菌数量均显著少于模型组($P<0.05$);3个剂量组中,中、高剂量组与低剂量组间亦存在显著性差异($P<0.05$),但中高剂量组间差异不明显。[结论]蛹虫草固体饮料对于抗生素干扰引起的肠道菌群失调具有较好的修复作用,可调节并保持肠道微生物群的平衡。

关键词 蛹虫草;固体饮料;抗生素;肠道菌群

中图分类号 TS275.4 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)29-0124-02

Effect of a Kind of *Cordyceps militaris* Solid Beverage on the Intestinal Flora of Mice

JIA Jun-jie, YAN Chi, SHAO Ying* et al (Jiangsu Key Construction Laboratory of Food Resource Development and Quality Safe, Xuzhou Institute of Technology, Xuzhou, Jiangsu 221008)

Abstract [Objective] The research aimed to study the the effect of a kind of *Cordyceps militaris* instant powder (Youyuan tea) on the intestinal flora of mice. [Method] Antibiotics (penicillin sodium) was used to build the alteration of intestinal flora illness model of mice, the normal mice were used as control and the colony counting method was used to explore the effect of a kind of *Cordyceps militaris* solid beverage on the intestinal flora of mice. [Result] The weight of mice in high and medium dose group was higher than other groups dramatically ($P<0.05$). The quantity of probiotics such as lactobacillus and bifidobacterium in the mice intestinal canal of dose groups was higher than that of model group, and the quantity of conditioned pathogen such as enterococcus was lower than the model group ($P<0.05$); there was a significant difference existed among the low dose group and the middle, high dose group, but the difference between middle and high dose groups was not obvious. [Conclusion] The *Cordyceps militaris* solid beverage has better recovery effect on the alteration of intestinal flora which was caused by antibiotics, and it also could adjust and maintain the balance of intestinal microecology.

Key words *Cordyceps militaris*; Solid beverage; Antibiotics; Intestinal flora

动物肠道是巨大的细菌库,同时也是动物用来消化食物和吸收营养的主要部位。健康动物肠道菌群中有益微生物与有害微生物的种类及数量长期处于动态平衡状态,肠道微生态环境得以有效维持,使得肠道菌群发挥促进营养消化与吸收、抵御外来病原菌入侵的作用^[1-3]。肠道微生态平衡若被破坏,则会影响肠道功能,引发许多胃肠道疾病^[4-5]。肠道中微生物的变化与粪便菌群的构成密切相关,因此可以通过粪便菌群的研究了解动物肠道菌群的变化^[6]。

蛹虫草(*Cordyceps militaris*)又名北冬虫夏草,为我国传统滋补性中药,是虫草属的模式种,因其生物活性与冬虫夏草相似,被用作冬虫夏草的良好代用品^[7]。蛹虫草中富含虫草酸、虫草素、氨基酸、虫草多糖、核苷等成分,具有抗菌、消炎、抗癌、增强免疫力等药理活性^[8-10]。现有的研究表明,蛹虫草子实体及蛹虫草无性型蛹拟青霉液体发酵代谢产物均表现出一定的抑菌活性^[11-12]。以蛹虫草为原料开发蛹虫草饮料、食品、保健食品已成为许多食品开发企业和食品行业工作者的研发重点。笔者以江苏康能生物工程股份有限公司提供的一种蛹虫草子实体为原料生产的一种固体饮料(佑元茶)为试验原料,为了明确该固体饮料的功能,以正常小鼠为对照,建立了抗生素(青霉素钠)引起的肠道菌群失调模型

和不同剂量蛹虫草粉固体饮料灌胃模型与对照小鼠进行比较,研究蛹虫草固体饮料对肠道菌群失调小鼠肠道微生态环境的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 昆明种小鼠,购于济南朋悦实验动物繁育有限公司,体重18~22 g,雄性。蛹虫草固体饮料,由江苏康能生物工程股份有限公司提供,由蛹虫草子实体的水提酶解液添加糊精经喷雾干燥制成,商品名为佑元茶。青霉素钠,山东鲁抗医药股份有限公司。BS培养基、肠球菌琼脂、麦康凯培养基、乳酸杆菌选择性琼脂,杭州百思生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备 立式压力蒸汽灭菌锅,宁波久兴医疗器械有限公司;SPX-205B-Z型生化培养箱,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;HYQ-3111旋涡混匀器,上海精宏实验设备有限公司;TGL-16G台式离心机,上海安亭科学仪器厂;梅特勒电子天平,AE2000型,上海分析仪器厂;超净工作台,海博迅实业有限公司医疗设备厂。

1.3 方法

1.3.1 抗生素诱导小鼠肠道菌群失调模型的建立及分组。 昆明种小鼠50只(雄性)适应性饲喂7 d后,随机抽取10只作为空白对照组。其余40只按照0.9 mg/g的剂量灌胃青霉素钠,连续灌胃7 d,当小鼠出现腹泻、行动迟缓等症状即为造模成功。造模成功后,将小鼠随机分为模型组、蛹虫草固体饮料高剂量组、蛹虫草固体饮料中剂量组、蛹虫草固体饮料低剂量组,每组10小鼠。小鼠共分5组。

1.3.2 小鼠的给药。 小鼠分组后,给予对照组和模型组小

基金项目 江苏省科技计划项目(BN2016003, BE2017352, BN2015012);江苏省高校自然科学研究重大专项(15KJA180008)。

作者简介 贾俊杰(1995-),男,江苏泰州人,本科生,专业:生物工程。*通讯作者,副教授,博士,从事微生物资源开发与应用研究。

收稿日期 2017-08-18

鼠灌胃生理盐水,蛹虫草固体饮料高、中、低剂量组按照蛹虫草固体饮料日摄入量(中剂量组剂量根据 50 kg 成人日摄入 10 g 蛹虫草固体饮料换算)换算分别给予 100、200 和 400 mg/kg 蛹虫草固体饮料进行灌胃处理。各组均灌胃 14 d。

1.3.3 小鼠体重变化记录。小鼠饲喂过程中,每天观察小鼠活动和饮食情况,并在试验进行的第 1、第 7 和第 14 天称量并记录小鼠的体重。

1.3.4 肠道菌群的计数。小鼠最后一次灌胃 24 h 后,采集每组小鼠的粪便,每组采集 0.5 g,将粪便收集于无菌的干燥试管中。使用无菌水稀释振荡,当粪便完全均质后采用 10 倍稀释法对粪便稀释液进行梯度稀释,选择合适稀释度下的稀释液涂布于各种供试培养基。在合适温度条件下培养

24 ~ 48 h 后记录培养基中的菌落数量,换算每克小鼠粪便中双歧杆菌、乳酸杆菌、肠杆菌和肠球菌的数量。各种微生物数量取对数进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 蛹虫草固体饮料对小鼠体重的影响 由表 1 可知,对照组小鼠体重呈现缓慢增长的趋势,模型组小鼠的体重逐渐下降,试验组小鼠灌胃结束时小鼠体重显著高于模型组小鼠($P < 0.05$)。蛹虫草固体饮料高、中、低 3 个剂量组的小鼠体重呈上升的趋势,高、中剂量组小鼠体重显著高于对照组和低剂量组($P < 0.05$),而高剂量组和中剂量组小鼠体重间无显著性差异。说明适量摄入蛹虫草固体饮料可以增加小鼠重量、提高小鼠生长能力。

表 1 小鼠体重变化情况
Table 1 The change of mice body weight

组别 Group	第 1 天 The first day	第 7 天 The seventh day	第 14 天 The fourteenth day
对照组 Control group	19.78 ± 0.63	20.17 ± 0.61	20.84 ± 0.24 b
模型组 Model group	19.93 ± 0.16	18.32 ± 0.35	18.01 ± 0.61 c
蛹虫草固体饮料高剂量组 High dose group of <i>Cordyceps militaris</i> solid beverage	19.86 ± 0.76	20.97 ± 0.14	21.56 ± 0.28 a
蛹虫草固体饮料中剂量组 Medium dose group of <i>Cordyceps militaris</i> solid beverage	20.34 ± 0.27	20.61 ± 0.13	21.14 ± 0.85 a
蛹虫草固体饮料低剂量组 Low dose group of <i>Cordyceps militaris</i> solid beverage	19.89 ± 0.35	20.09 ± 0.19	20.96 ± 0.43 b

注:不同小写字母表示各组间差异显著($P < 0.05$)
Note: Different lowercase letters indicate significant differences between groups($P < 0.05$)

2.2 蛹虫草固体饮料对小鼠肠道菌群的影响 使用 3 种不同剂量的蛹虫草固体饮料对小鼠进行灌胃后,采用平板计数法对小鼠粪便中的双歧杆菌、乳酸杆菌、肠杆菌、肠球菌进行了计数,以考察蛹虫草固体饮料对小鼠肠道菌群的影响。由表 2 可知,模型组小鼠在抗生素停止干扰后,肠道中乳酸杆菌、肠杆菌、肠球菌逐步开始生长,但双歧杆菌却未见生长,

说明小鼠在肠道菌群失调后具有一定的自我修复作用。小鼠肠道菌群失调后给予蛹虫草固体饮料进行灌胃,3 个剂量组小鼠肠道中的双歧杆菌、乳酸杆菌的数量均显著高于模型组($P < 0.05$),而肠球菌的数量却显著低于对照组和模型组($P < 0.05$),但是肠杆菌在数量上未表现出明显的变化。说明蛹虫草固体饮料针对肠道菌群失调群体具有明显的调节作用。

表 2 蛹虫草固体饮料对小鼠肠道菌群的影响
Table 2 Effect of *Cordyceps militaris* solid beverage on the intestinal flora of mice

组别 Group	双歧杆菌 Bifidobacterium	乳酸杆菌 Lactobacillus	肠杆菌 Enterobacter	肠球菌 Enterococcus
对照组 Control group	5.91 ± 0.45 [#]	7.26 ± 0.58 [#]	4.36 ± 0.62	6.54 ± 0.76 [#]
模型组 Model group	ND [*]	6.08 ± 0.61 [*]	3.30 ± 0.83	6.96 ± 0.23 [*]
蛹虫草固体饮料高剂量组 High dose group of <i>Cordyceps militaris</i> solid beverage	6.81 ± 0.32 ^{**}	7.72 ± 0.24 ^{**}	4.39 ± 0.44	5.23 ± 0.28 ^{**}
蛹虫草固体饮料中剂量组 Medium dose group of <i>Cordyceps militaris</i> solid beverage	5.96 ± 0.38 [#]	7.35 ± 0.43 ^{**}	4.63 ± 0.27	5.31 ± 0.94 ^{**}
蛹虫草固体饮料低剂量组 Low dose group of <i>Cordyceps militaris</i> solid beverage	5.89 ± 0.29 [#]	7.06 ± 0.33 ^{**}	4.45 ± 0.62	5.60 ± 0.15 ^{**}

注: * 与对照组相比, # 与模型组相比($P < 0.05$); ND 指未检出

3 讨论与结论

蛹虫草作为我国传统的中药资源越来越得到人们的重视,因为蛹虫草资源广泛的生物活性和食用后的无毒副作用使其在 2009 年被我国卫生部批准为新资源食品。该研究根据蛹虫草新资源食品成人的每日食用量(蛹虫草子实体成人每日食用剂量不超过 2 g)研发蛹虫草固体饮料,推荐的固体饮料成人人均摄入量为 10 g,换算成小鼠的灌胃剂量对小鼠进行灌胃处理,探讨蛹虫草固体饮料对经抗生素干扰的肠道菌群失调小鼠的肠道修复效果。

随着微生物生态学研究的深入,人们越来越认识到肠道微生物

物对人类健康的作用。正常的微生物群落决定宿主的生物过程,因此菌群失调会引发多种胃肠道疾病的发生。该研究结果表明,蛹虫草固体饮料可以有效增加肠道菌群失调小鼠肠道内双歧杆菌、乳酸杆菌的恢复,使其数量显著增加,同时明显减少肠道中肠球菌的数量。供试的 3 个剂量组间,高、中剂量组对肠道菌群的修复效果明显好于低剂量组,说明蛹虫草固体饮料在一定的浓度范围内才会发挥修复功效。

抗生素对肠道菌群的平衡有破坏作用,蛹虫草为原料酶解后开发的固体饮料的使用可以有效增加肠道中有益微生物

第一类群在遗传相似性系数为 0.53 处,又可分为 2 亚类。第 1 亚类为大部分的白肋烟材料和部分烤烟材料,第 2 亚类为全部晒烟、香料烟、部分烤烟以及部分白肋烟材料。

以上结果可以说明:分子标记技术在烟草资源遗传亲缘关系分析中的高效性;晾晒烟种质资源材料与烤烟种质资源材料遗传亲缘关系相对较远,而不同晾晒烟种质资源材料之间(包含白肋烟、晒烟、香料烟)的遗传亲缘关系很近。

3 结论与讨论

随着分子生物学的发展及分子标记技术的建立,越来越多的分子标记被应用到烟草种质鉴定、遗传图谱的构建、抗病性研究等工作中^[2-7,9]。该研究中 SSR、EST-SSR 和 InDel 这 3 种分子标记多态性丰富,稳定性强,试验条件较易掌握,都是很好的烟草遗传多样性分析的分子标记方法。但是与 EST-SSR 和 SSR 分子标记相比,InDel 分子标记以其扩增谱带少、特异性强,易于识别和统计,因而更适合用于烟草种质资源遗传多样性分析与研究。

遗传多样性对物种的生存和发展起着决定性的作用,遗传多样性高,对环境变化的适应能力强,容易扩展其分布范围并孕育成新的品种,因此对遗传多样性的研究,可以探讨物种之间的亲缘关系,同时还有助于充分发现和利用各种基因资源,挖掘重要经济性状的变异并加以科学利用和开发。烟草传入我国已有 400 多年时间,虽然经过 400 多年的人工驯化和培养以及不断地从国外引进已经形成的品种资源,但是近年烟草育种中广泛使用的主体亲本只有少数几种,导致我国育成烟草品种遗传基础日益狭窄^[13-14],该研究结果也从分子水平上印证了我国烟草育种资源的匮乏。该研究还发现相同栽培类型的烟草明显地聚为一类,说明烟草经过各自的生态环境和人为利用目的不同的长期选择而逐渐形成

了不同的栽培类型,类型间的差别更多的是因特定生态条件下次生代谢的不同而形成。同时,还发现个别烟草材料偏离原有类型,与其他类型聚为一类,原因一可能是与其血缘关系有关,二可能是与分子标记的偏好有关。

参考文献

[1] 国家烟草专卖局. 中国烟草年鉴:2011-2012[M]. 北京:中国科学技术出版社,2012.

[2] 祁建民,梁景霞,陈美霞,等. 应用 ISSR 与 SRAP 分析烟草种质资源遗传多样性及遗传演化关系[J]. 作物学报,2012,38(5):1425-1434.

[3] 杨友才,周清明,尹晗琪. 利用 RAPD 和 AFLP 标记分析烟草种质资源的遗传多样性[J]. 农业生物技术学报,2006,14(4):585-593.

[4] 马冰,代帅帅,程亚增,等. 烤烟种质资源 SSR 核心引物的筛选及验证[J]. 中国烟草科学,2016,37(5):1-5,9.

[5] 曾建敏,陈学军,吴兴富,等. 基于烟草叶绿体基因组和线粒体基因组 SSR 标记的烟属植物遗传多样性分析[J]. 中国烟草学报,2016,22(4):89-97.

[6] 张铭真,邢雪霞,李晓辉,等. 烟草种质资源遗传多样性与群体结构分析[J]. 中国烟草科学,2016,37(4):42-47.

[7] 冯俊彦,蒲志刚,李明,等. 9 份烟草品种(系)及其航天诱变后代的 TRAP 分析[J]. 西南农业学报,2017,30(2):273-279.

[8] CAI C, YANG Y, CHENG L, et al. Development and assessment of EST-SSR marker for the genetic diversity among tobaccos (*Nicotiana tabacum* L.) [J]. Genetika, 2015, 51(6):694-703.

[9] BINDLER G, VAN DER HOEVEN R, GUNDUZ I, et al. A microsatellite marker based linkage map of tobacco [J]. Theor Appl Genet, 2007, 114(2):341-349.

[10] SIERRO N, BATTEY J N D, OUADI S, et al. The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato [J]. Nat Commun, 2014, 5:3833.

[11] SIERRO N, BATTEY J N D, OUADI S, et al. Reference genomes and transcriptomes of *Nicotiana sylvestris* and *Nicotiana tomentosiformis* [J]. Genome Biol, 2013, 14(6):60.

[12] 李斯更,沈镭,刘博,等. 基于黄瓜基因组重测序的 InDel 标记开发及其应用[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(2):278-283.

[13] 王元英,周健. 中美主要烟草品种亲源分析与烟草育种[J]. 中国烟草学报,1995,2(3):11-22.

[14] 杨友才,周清明,尹晗琪,等. 烟草种质资源遗传多样性及亲缘关系的 AFLP 分析[J]. 中国农业科学,2006,39(11):2194-2199.

(上接第 125 页)

物的数量,抑制有害微生物的生长繁殖。因此,蛹虫草固体饮料可以作为肠道菌群调节剂使用,值得对该蛹虫草固体饮料的具体成分进行进一步研究。

参考文献

[1] 任景乐,李文立,宋晓娜,等. 复合乳酸菌制剂对蛋种鸡育雏期生长性能、免疫机能和盲肠微生物的影响[J]. 中国家禽,2014,36(7):32-37.

[2] CAESAR R, FÅK F, BÄCKHED F. Effect of gut microbiota on obesity and atherosclerosis via modulation of inflammation and lipid metabolism[J]. Journal of internal medicine, 2010, 268(4):320-328.

[3] SEKIROV I, RUSSELL S L, ANTUNES C M, et al. Gut microbiota in health and disease[J]. Physiological reviews, 2010, 9(3):859-904.

[4] MALAISSE W J, COURTOIS P, SCOTT F W. Insulin-dependent diabetes and gut dysfunction: The BB rat model[J]. Horm Metab Res, 2004, 36(9):585-594.

[5] 刘洪明. 益生菌-黄芪多糖合生元的研制及其对腹泻犊牛肠道菌群结构影响的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2009.

[6] 王丽凤. 益生菌 *L. plantarum* P-8 对肉鸡肠道菌群、肠道免疫和生长性能影响的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2014.

[7] 梁宗琦,刘爱英,刘作易. 中国真菌志:虫草属[M]. 北京:科学出版社, 2007:1-190.

[8] ZHANG G Q, HUANG Y D, BIAN Y, et al. Hypoglycemic activity of the fungi *Cordyceps militaries*, *Cordyceps sinensis*, *Tricholoma mongolicum* and *Omphalia lapidescens* in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 72(6):1152-1156.

[9] KUO M C, CHANG C Y, CHENG T L, et al. Immunomodulatory effect of exo-polysaccharides from submerged cultured *Cordyceps sinensis*: Enhancement of cytokine synthesis, CD11b expression, and phagocytosis[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 75(4):769-775.

[10] RAO Y K, FANG S H, WU W S, et al. Constituents isolated from *Cordyceps militaris* suppress enhanced inflammatory mediator's production and human cancer cell proliferation[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 131(2):363-367.

[11] 燕心慧,齐秋月,汪世华,等. 蛹虫草子实体活性成分的分离鉴定[J]. 菌物学报,2016,35(5):605-610.

[12] 徐德峰,孙力军,王雅玲. 蛹虫草抑菌活性研究开发现状与发展趋势[J]. 食品工业科技,2012,33(8):424-427.