

黑果枸杞多糖对菌群人源化小鼠肠道微生物调节研究

王莉, 林芝雨, 庞旭涛, 刘健 (南昌大学科学技术学院, 江西南昌 330029)

摘要 [目的]以菌群人源化小鼠(HFA-小鼠)作为模型,研究不同浓度黑果枸杞多糖对HFA小鼠肠道微生物的影响。[方法]征集一名健康志愿者,通过接种志愿者的粪便悬液构建HFA小鼠模型,将40只HFA小鼠随机分为4组,黑果枸杞多糖低剂量组(CT+LPL)灌胃枸杞多糖50 mg/kg,黑果枸杞多糖中剂量组(CT+LPM)灌胃枸杞多糖100 mg/kg,黑果枸杞多糖高剂量组(CT+LPH)灌胃枸杞多糖200 mg/kg,正常对照组(CT)每天灌胃同体积的生理盐水。连续灌胃21 d,试验期间记录各组小鼠的体重变化,第22天处死小鼠后,取标本进行各项指标检测。[结果]CT+LPM组小鼠体重低于CT组,呈显著性差异($P < 0.05$),CT+LPM组HFA小鼠肠道中乳酸杆菌和双歧杆菌数量较CT组均增加,肠杆菌和肠球菌数量均减少,差异显著($P < 0.01$),CT+LPM组HFA小鼠肠黏膜sIgA含量极显著高于CT组($P < 0.01$)。[结论]黑果枸杞多糖能够改善HFA小鼠肠道菌群环境,具有益生元作用,也能促进HFA小鼠肠黏膜sIgA的分泌。

关键词 黑果枸杞多糖;菌群人源化小鼠;肠道菌群;免疫球蛋白A

中图分类号 TS201.4 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)01-0178-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.01.054

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Regulation Research of *Lycium ruthenicum* Polysaccharide on Gut Microbes in HFA Mice

WANG Li, LIN Zhi-yu, PANG Xu-tao et al (College of Science and Technology, Nanchang University, Nanchang, Jiangsu 330029)

Abstract [Objective] To study the effects of different concentrations of *Lycium ruthenicum* polysaccharide on the gut microbes of HFA mice using the source-based mice (HFA-mice) as a research model. [Method] A healthy volunteer was recruited to construct a HFA mouse model by inoculating the volunteers' faecal suspension, 40 HFA mice were randomly divided into four groups, with the *Lycium ruthenicum* polysaccharide low dose group (CT-LPL) infused with polysaccharide 50 mg/kg, and the *Lycium ruthenicum* polysaccharide medium dose group (CT-LPM) infused with polysaccharide 100 mg/kg, the high-dose group of *Lycium ruthenicum* polysaccharide (CT-LPH) infused with polysaccharide 200 mg/kg, the normal control group (CT) infused the stomach with the same volume of saline every day. The weight changes of each group of mice were recorded during the experiment, execution of the mice after 21th day, the samples were tested for various indicators. [Result] Compared with the CT group, the weight of the mice in the CT-LPM group decreased significantly, showing significant differences ($P < 0.05$), the number of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in the intestines of the HFA mice in the CT-LPM group increased, the number of Enterobacteriaceae and Enterococcus decreased, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$), the content of intestinal mucosa sIgA in the CT+LPM group was significantly higher than CT group ($P < 0.01$). [Conclusion] *Lycium ruthenicum* polysaccharide can improve the environment of intestinal microbe in HFA mice, which have a probiotic effect, and can also promote the secretion of sIgA in HFA mice.

Key words *Lycium ruthenicum* polysaccharide; Human flora-associated mice; Gut microbes; Immunoglobulin A

黑果枸杞(*Lycium ruthenicum* Murr.)为茄科、枸杞属,主要分布于我国陕西北部、宁夏、甘肃等地,成熟干燥时食用,黑果枸杞味甘、性平、清心热。黑果枸杞多糖(*Lycium ruthenicum* polysaccharide, LP)具有抗疲劳、消炎、抗氧化、降血糖、改善机体免疫等多种保健功能^[1-2]。天然药物多糖对肠道微生物菌群失调有良好的调节作用,如黄芩多糖、灵芝多糖、蒲公英多糖等^[3-5],目前黑果枸杞多糖对肠道微生物微生态调节方面的文章鲜有报道。

实验动物的生理代谢及肠道菌群组成与人的肠道菌群组成和代谢有明显差异,利用动物模型研究肠道菌群对动物各种疾病及健康的影响已有很多,但要研究人肠道菌群对人类疾病及健康的影响却比较困难,HFA(human flora-associated)小鼠能相对真实地反映人肠道中的菌群环境,该模型已被证实是在肠道菌群的研究方面是可行的,并且可有效地避免人体实验的伦理问题^[6-7]。笔者拟用HFA小鼠,研究黑果枸杞多糖对小鼠肠道菌群中细菌的影响,为膳食营养干预肠道菌群提供理论参考。

1 材料与方

1.1 动物、材料与试剂 无菌昆明(KM)小鼠,由南昌大学

实验动物中心提供。

黑果枸杞产地为甘肃银川,经鉴定为茄科植物黑果枸杞的成熟果实,黑果枸杞多糖由笔者所在实验室提取纯化。

BS、MRS、EC、EMB培养基(天根生化科技有限公司);sIgA试剂盒(上海康朗生物科技有限公司);乙醇、苯酚、琼脂、葡萄糖均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备 JJ-CJ-1D超净工作台(成都一科仪器设备有限公司);BKQ-B100II灭菌锅(广州市科洋医疗设备有限公司);DHP-500电热恒温培养箱(常州中捷实验仪器制造有限公司);EU-2800DS紫外可见分光光度计(上海美析仪器有限公司);Thermo多功能酶标仪(山东博科科学仪器有限公司);N-110-D型旋转蒸发仪(上海亚荣仪器设备有限公司);葡萄糖标准品(纯度 $\geq 99\%$)(上海楷岳生物科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 黑果枸杞多糖的制备。取黑果枸杞干粉末5.0 g,80%乙醇预处理,按提取温度90℃,液料比30:1,提取时间2 h,提取2次后,浓缩水提液,加入氯仿:正丁醇=5:1试剂,充分振荡离心6次,95%乙醇溶液搅拌,冷藏过夜,离心,70%乙醇洗涤,减压干燥得黑果枸杞多糖^[8]。

1.3.2 HFA小鼠模型的构建。无菌KM小鼠40只,4周龄,体质量(25 \pm 2)g,雌雄各50%。招募一位体格健康的志

基金项目 江西省教育厅科学技术研究项目(171456)。

作者简介 王莉(1980—),女,陕西白水人,讲师,从事细胞生物学和发育生物学研究。

收稿日期 2019-07-18

愿者(女,25岁,无消化道及代谢疾病,90 d内未服用抗生素),取志愿者清晨第1次排出的粪便,无菌收集,1 h内在无菌厌氧条件下称重,以质量比1:9($m:V$)加入 Wikins-Chalgren 厌氧肉汤(Oxoid)稀释,振荡混匀后获得悬液。取悬液灌胃(每只小鼠0.3 mL)接种于40只无菌KM小鼠体内,人肠道菌群在小鼠肠道内定殖21 d后得到HFA小鼠模型^[9]。

HFA小鼠饲养于无菌动物房内,环境温度20~23℃,湿度40%~70%,12 h光照+12 h黑暗,无菌鼠基饲料、无菌水饲养,实验期间自由摄食饮水。

1.3.3 动物分组和给药。将40只HFA小鼠随机分为4组,每组10只:正常对照组(CT)、黑枸杞多糖低剂量组(CT+LPL)、黑枸杞多糖中剂量组(CT+LPM)、黑枸杞多糖高剂量组(CT+LPH)。实验期间,每天对小鼠进行定时灌胃,枸杞多糖低剂量组,灌胃枸杞多糖50 mg/kg;枸杞多糖中剂量组,灌胃枸杞多糖100 mg/kg;枸杞多糖高剂量组,灌胃枸杞多糖200 mg/kg,正常对照组每天灌胃同体积的生理盐水,连续灌胃21 d,饲养期间小鼠自由摄食饮水。实验期间记录各小鼠的体重变化,第22天处死小鼠后,取标本进行各项指标检测。

1.3.4 小鼠肠道菌液的制备及接种。将小鼠固定于解剖板上,75%乙醇消毒皮肤后,切开腹部,无菌采集盲肠内容物,置内容物于无菌试管中,超净工作台上称取1.0 g盲肠内容物,加9 mL无菌生理盐水混合,振荡器上振荡15 min,得肠内容物悬液。取装有9 mL灭菌生理盐水的试管6支,依次稀释盲肠内容物,直至稀释倍数为 10^{-5} 。样品稀释度按照双歧杆菌(10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5})、乳酸杆菌(10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5})、肠杆菌(10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4})、肠球菌(10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4})、用移液器取不同稀释度的样品0.2 mL于不同的选择培养基上,涂布培养,每个稀释度下每种培养基做3个平行板。

1.3.5 小鼠肠道菌群的培养及计数。小鼠肠道内容物培养细菌名称、培养基、培养条件、鉴定方法等见表1。

表1 肠道菌群培养及鉴定方法

Table 1 Culture and identification method for the intestinal bacterial

细菌名称 Bacterial name	培养基 Culture medium	培养条件 Culture condition	鉴定方法 Identification method
双歧杆菌 <i>Bifidobacterium</i>	BS琼脂	厌氧 37℃ 48 h	G ⁺ 杆菌、微白色、光滑凸起、菌落圆形有光泽
乳酸杆菌 <i>Lactobacillus</i>	MRS琼脂	厌氧 37℃ 48 h	G ⁺ 杆菌、菌落乳白色不透明
肠杆菌 Enterobacteriaceae	EMB琼脂	需氧 37℃ 24 h	G ⁻ 杆菌、菌落暗红色有金属光泽、发酵乳糖
肠球菌 Enterococcus	EC琼脂	需氧 37℃ 24 h	G ⁺ 球菌、菌落灰白色、有褐色圈

培养结束后,常规平板活菌计数法计数,计算出各种菌落同一稀释度的平均菌落数 α ,根据公式分别计算各种菌落3种稀释度样品的菌落总数,最终结果以每克粪便中菌落数的对数值表示。计数时选取平板菌落数为30~300个的平板为宜^[10]。

$$\text{菌落总数}[\lg(\text{CFU/g})] = \frac{\alpha \times \text{稀释倍数}}{0.1 \times 1.0}$$

1.3.6 小鼠肠黏膜 sIgA 含量的检测。取小鼠肠道末端2 cm回肠置于无菌烧杯中,以无菌冰浴磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)冲洗回肠腔,至粪便全部去除,取1 g回肠黏膜加5 mL PBS缓冲液,在冰上用10 mL玻璃匀浆器进行匀浆处理,4℃下1 000 r/min离心10 min,收集上清液置于-20℃备用。按sIgA试剂盒说明书测定回肠黏膜中分泌型免疫球蛋白含量^[11]。

1.4 统计分析 采用SPSS 20.0软件对数据进行统计分析,结果以均值($\bar{X} \pm S$)表示,显著性分析采用单项方差分析,组间多重比较采用LSD检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 黑枸杞多糖对HFA小鼠体重的影响 由表2可知,与试验前相比,试验后各组小鼠的体重都有明显增加。与CT组相比较,CT+LPL组和CT+LPH组小鼠体重均有增加,但无显著性差异($P > 0.05$);CT+LPM组小鼠体重明显低于CT组,呈显著性差异($P < 0.05$)。说明黑枸杞多糖可有效控制HFA小鼠体重,对HFA小鼠肠道微生物代谢有一定的调节作用,可影响机体能量代谢。

表2 各组小鼠体重变化($n=12$)

Table 2 The change for mouse body weight in all groups ($n=12$) g

组别 Group	小鼠灌胃前体重 Weight of mice before gastric administration	小鼠灌胃后体重 Weight of mice after gastric administration
CT	25.21±0.53	34.63±1.01
CT+LPH	25.42±0.62	33.13±0.67*
CT+LPM	25.50±0.65	32.53±0.54**
CT+LPL	25.30±0.84	33.20±0.37*

注:与CT组相比较,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$

Note: Compared with CT group,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$

2.2 黑枸杞多糖对HFA小鼠肠道菌群的影响 由表3可知,与CT组相比,3个剂量组HFA小鼠肠道中乳酸杆菌、双歧杆菌数量都显著增加,而肠杆菌、肠球菌数量显著下降($P < 0.05$)。与CT组相比较,CT+LPM组HFA小鼠肠道中乳酸杆菌和双歧杆菌数量均增加,肠杆菌和肠球菌数量均减少,差异显著($P < 0.01$);与CT组相比较,CT+LPH和CT+LPL组HFA小鼠肠道中乳酸杆菌和双歧杆菌数量均增加,肠杆菌和肠球菌数量均减少,差异显著($P < 0.05$)。说明黑枸杞多糖可调节HFA小鼠肠道菌群结构,增加有益菌在HFA小鼠肠道中的定殖力。

2.3 HFA小鼠肠黏膜sIgA含量 由表4可知,与CT组相比较,3个剂量组肠黏膜sIgA含量均有所升高,差异显著($P < 0.05$)。其中CT+LPM组肠黏膜sIgA含量极显著高于CT组($P < 0.01$);CT+LPM组肠黏膜sIgA含量显著高于CT+LPH和CT+LPL组($P < 0.05$)。说明黑枸杞多糖可以改善肠道sIgA含量,但肠道中sIgA含量并非随着黑枸杞多糖添加量增多而升高。

表3 HFA小鼠肠道中细菌数量($n=12$)Table 3 The bacterial counts in HFA mouse intestine ($n=12$)

组别 Group	双歧杆菌 <i>Bifidobacterium</i>	乳酸杆菌 <i>Lactobacillus</i>	肠杆菌 Enterobacteriaceae	肠球菌 Enterococcus
CT	9.925 0±0.511 0	9.255 0±0.041 0	8.627 3±0.061 0	7.498 3±0.042 4
CT+LPH	10.101 0±0.703 0*	9.537 0±0.052 6*	8.470 4±0.067 5*	7.243 7±0.052 9*
CT+LPM	10.435 0±0.067 2**	9.765 0±0.013 0**	8.124 9±0.005 0**	7.003 1±0.008 3**
CT+LPL	10.237 0±0.081 1*	9.626 3±0.047 3*	8.453 1±0.070 6*	7.216 5±0.081 4*

注:与CT组相比较,* $P<0.01$,** $P<0.05$ Note:Compared with CT group,** $P<0.01$,* $P<0.05$ 表4 HFA小鼠肠黏膜sIgA含量($n=12$)Table 4 Contents of sIgA in HFA mouse intestinal mucosa ($n=12$)

组别 Group	OD ₄₅₀	sIgA/μg/mL
CT	0.096 0±0.002 9	5.378 7±0.114 5
CT+LPH	0.097 7±0.003 2	5.747 0±0.114 7*
CT+LPM	0.118 3±0.003 1	6.230 7±0.114 5**
CT+LPL	0.108 0±0.002 5	5.794 0±0.094 6*

注:与CT组相比较,* $P<0.01$,** $P<0.05$ Note:Compared with CT group,** $P<0.01$,* $P<0.05$

3 讨论

近年来,肠道菌群对人类健康的影响受到越来越广泛的关注,一方面肠道菌群不仅促进人体健康,调节人体代谢;另一方面人类的某些疾病是因肠道微生物失衡造成的,比如肥胖、乳糜泻、炎症性肠道疾病等^[12]。肥胖在我国已成为青少年健康的最大危害因素之一,已有研究发现肥胖和个体肠道微生物菌群之间有着密切的关系^[13]。随着越来越多学者对肠道菌群的研究发现通过移植外援肠道微生物群可以恢复患者肠道微生物群落平衡,此项技术可以作为对某些疾病治疗的有效手段^[14]。利用动物模型研究食物及药物对人类疾病的影响是临床上常用的研究方法,但动物与人的肠道菌群种类不同,生理代谢也有明显差异。该试验构建的菌群人源化动物模型,比普通动物模型在研究肠道微生态方面更具有优势。

肠道菌群在机体肠道中存在动态平衡,维持机体正常代谢,而双歧杆菌和乳杆菌为肠道中的优势菌,可抑制病原菌在肠道的定殖,维持肠道微生态平衡。在该试验中,与空白组相比较,3个剂量组HFA小鼠肠道内双歧杆菌、乳酸杆菌菌群数量都有明显增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$),肠杆菌和肠球菌数量减少($P<0.05$),说明黑枸杞多糖能够调节肠道菌群,刺激肠道内原有有益菌双歧杆菌和乳酸杆菌的增殖,抑制肠杆菌和肠球菌的繁殖,起到益生元的作用。

sIgA是肠黏膜上的主要免疫球蛋白,作为肠道黏膜上的第一道防线,其可以阻止各种内源性共生菌及外源性致病菌的侵入。该试验中,与空白组相比较,3个剂量组HFA小鼠肠道黏膜sIgA含量都增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$),说明黑枸杞多糖能促进HFA小鼠肠黏膜sIgA的分泌,增强HFA小鼠肠道免疫功能。而肠黏膜液sIgA也对肠道菌有调节作用,可以促进肠道菌群平衡,阻止食物中外来致病菌的侵入,进一步保护平衡肠道微生物菌群,提高机体免疫力。

参考文献

- [1] 汪建红,陈晓琴,张蔚佼.黑果枸杞果实多糖抗疲劳生物功效及其机制研究[J].食品科技,2009,34(2):203-207.
- [2] 张玲艳,王宏权.黑枸杞花青素的提取及其抗氧化活性研究[J].食品工业,2014,35(12):88-91.
- [3] 李树鹏,赵献军.黄芪多糖及益生菌合生元对雏鸡肠道微生态区系的影响[J].家畜生态学报,2005,26(3):21-25.
- [4] 石丹,张宇.蒲公英多糖对小鼠肠道微生态的调节作用[J].微生物学免疫学进展,2016,44(3):49-53.
- [5] 韩伟东,李丽秋,马淑霞,等.香菇多糖对溃疡性结肠炎大鼠肠道微生态失调的调整作用研究[J].中国微生态学杂志,2011,23(5):423-425.
- [6] 张静,胡新中,李俊俊,等.燕麦β-葡聚糖与沙蒿胶多糖对菌群人源化小鼠生理及肠道微生物调节比较研究[J].食品科学,2015,36(9):146-153.
- [7] 曾本华,唐欣,李文霞,等.肥胖患者HFA小鼠模型的建立[J].中国微生态学杂志,2012,24(4):289-291.
- [8] 娄涛涛,金玲,陀扬凌,等.黑果枸杞多糖提取工艺及其含量测定中显色条件优化研究[J].亚太传统医药,2017,13(5):16-20.
- [9] 张晓婧,曾本华,刘智伟,等.两种不同品系小鼠的人源菌群模型的建立与肠道菌群的比较[J].中国微生态学杂志,2013,25(4):376-380.
- [10] 张艳,刘均斌,张晶,等.平板活菌计数法检测粪便中的肠道菌群[J].首都医科大学学报,2008,29(1):85-86.
- [11] 张圣方,赵龙玉,赵凤春,等.泰山蛹虫草多糖对免疫抑制小鼠肠道菌群及分泌型免疫球蛋白A的影响[J].食品科学,2015,36(5):148-152.
- [12] TILG H, MOSCHEN A R, KASER A. Obesity and the microbiota[J]. Gastroenterology, 2009, 136(5): 1476-1483.
- [13] 张晨虹,赵立平.肠道菌群在肥胖及相关的代谢性疾病发生发展中的地位 and 作用[J].前沿科学,2007(3):75-80.
- [14] BAKKEN J S. Fecal bacteriotherapy for recurrent *Clostridium difficile* infection[J]. Anaerobe, 2009, 15(6): 285-289.
- [15] 杨静,罗秋香,钱春荣,等.氮素对稻米蛋白质组分含量及蒸煮食味品质的影响[J].东北农业大学学报,2006,37(2):145-150.
- [16] 杨宝峰.水稻种子贮藏蛋白的多态性研究[D].金华:浙江师范大学,2008.
- [17] 张启莉.稻米蛋白质影响米饭蒸煮食味品质的研究[D].雅安:四川农业大学,2012.
- [18] MANDAL S, MANDAL R K. Seed storage proteins and approaches for improvement of their nutritional quality by genetic engineering[J]. Current science, 2000, 79: 576-589.
- [19] 吴殿星,舒小丽.稻米蛋白质的研究与利用[M].北京:中国农业出版社,2008:1-10.
- [20] 马建.几种电泳技术在水稻品种鉴定上的比较研究[D].延吉:延边大学,2005.

(上接第177页)

清蛋白电泳技术应用于稻米食味品质评价中,从蛋白质组分结构方面对稻米食味品质进行评价更加科学。

参考文献

- [1] 刘建,曹高燧,杜锦,等.中日泰优质稻米的外观及食味差异性研究[J].中国农业科技导报,2017,19(10):59-65.
- [2] 石吕.水稻精米蛋白质含量与稻米品质变化的关系[D].扬州:扬州大学,2017.
- [3] 沈鹏,罗秋香,金正勋.稻米蛋白质与蒸煮食味品质关系研究[J].东北农业大学学报,2003,34(4):378-381.
- [4] 王继馨,张云江,程爱华,等.水稻蛋白亚基含量对米饭食味的影响[J].中国农学通报,2008,24(1):89-92.