

桑叶多糖调节小鼠肠道菌群失调的研究

陈涟昊¹, 张霞¹, 孙世芳², 王菱枝¹, 车有², 赵骏^{1*}, 宋存江²

1. 天津中医药大学 中药学院, 天津 300193

2. 南开大学 生命科学学院, 天津 300071

摘要: **目的** 研究桑叶多糖对小鼠肠道菌群失调的调节作用。**方法** 利用盐酸林可霉素诱导小鼠肠道菌群失调。将造模成功的小鼠随机分为桑叶多糖组、乳酶生组、模型组, 另设置对照组。桑叶多糖组小鼠 ig 6.0 mg/mL 桑叶多糖溶液 0.6 mL (剂量 0.144 mg/g), 乳酶生组小鼠 ig 5.5 mg/mL 乳酶生混悬液 0.6 mL (剂量 0.132 mg/g)。2 次/d, 连续给药 7 d。模型组、对照组小鼠自行饮水。取小鼠的新鲜粪便, 提取肠道菌 DNA。16S 段 DNA 序列扩增, 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 法分析。比对各条带及样品, 进行聚类分析, 对各组小鼠肠道微生物群落结构进行主成分分析。**结果** DGGE 直观图分析, 经过自然恢复、桑叶多糖和乳酶生的作用, 小鼠肠道菌群种类有了明显的增加, 但与对照组小鼠的肠道菌群比较仍然有差别, 并不能完全恢复到原来的水平。聚类分析结果可以看出, 与对照组最接近的是乳酶生组, 其次是桑叶多糖组, 最后是自然恢复组。菌群落结构的主成分分析可以直观地看出, 桑叶多糖、乳酶生组小鼠肠道菌群与对照组关系最近, 模型组与对照组肠道菌群及其他组肠道菌群的差异明显。**结论** 桑叶多糖对小鼠肠道菌群失调有调节作用。

关键词: 桑叶多糖; 肠道菌群失调; DNA; 变性梯度凝胶电泳

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2015)06-0633-04

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2015.06.006

Regulation of *Morus alba* polysaccharides on disturbance of intestinal flora in mice

CHEN Lian-hao¹, ZHANG Xia¹, SUN Shi-fang², WANG Ling-zhi¹, CHE You², ZHAO Jun¹, SONG Cun-jiang²

1. College of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: **Objective** To study the regulation of *Morus alba* polysaccharides on disturbance of intestinal flora in mice. **Methods** Models of disturbance of intestinal flora in mice were induced by lincomycin hydrochloride. Mice with disturbance of intestinal flora were randomly divided into *M. alba* polysaccharides group, lactasin group, and model group. And other rats were selected as the control group. The mice in the *M. alba* polysaccharides group were ig administered with 6.0 mg/mL *M. alba* polysaccharides 0.6 mL (equivalent to dosage 0.144 mg/g), and those in lactasin group were ig administered with 5.5 mg/mL Lactasin Tablets 0.6 mL (equivalent to dosage 0.132 mg/g). The animals were given drugs twice daily, and lasted for 7 d. Mice in model and control groups were fed with water at the same time. DNA of intestinal flora was extracted from the fresh excrement of the mice. 16S DNA sequence amplification was done, and the analysis was determined via denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) method. Strips of samples were observed, the clustering analysis was carried out, and principal component analysis (PCA) method was used to analyze structures of intestinal flora in mice. **Results** It could be observed from DGGE that the species of intestinal flora in mice obviously increased after natural recovery, or treated by *M. alba* polysaccharides and lactasin. But there was still difference of the number of intestinal flora in mice between these three groups and the control group. The intestinal flora could not completely resume to the original level. The cluster analysis of these samples showed that control group was close to lactasin group, secondly *M. alba* polysaccharides, and then natural recovery group. Flora community structure PCA results of control group were near to those of *M. alba* polysaccharides and lactasin groups, however there were significant differences between model group and control group and other group. **Conclusion** *M. alba* polysaccharides has regulatory effects on disturbance of intestinal flora in mice.

Key words: *Morus alba* polysaccharides; disturbance of intestinal flora; DNA; DGGE

收稿日期: 2015-04-01

作者简介: 陈涟昊, 本科生。

*通信作者 赵骏 (1962—), 女, 教授, 从事中药有效成分的提取和应用。Tel: 15022408088 E-mail: zhaojun_022@sina.com

人肠道菌群数量庞大,正常情况下,肠道菌群和宿主、外界环境建立起一个动态的生态平衡,对人体的健康起着重要作用,任何打破其内外环境的举措都可导致菌群的失调,表现为肠道菌群的种类、数量、比例、定位和代谢特征的变化^[1]。桑叶多糖药效学研究发现,桑叶多糖具有显著的降血糖作用,同时又抑制血脂升高^[2];将不同相对分子质量段的桑叶多糖对糖尿病大鼠模型进行降血糖药效实验,实验证明重均相对分子质量为 $1.12 \times 10^5 \sim 1.22 \times 10^5$ 多糖组分具有降血糖作用^[3]。桑叶多糖在体外模拟胃液降解率极低,提示桑叶多糖是以原型进入小肠,可能对肠道菌群平衡具有一定的调控作用。本实验采用分子生态学(PCR-DGGE法)技术分析肠道菌群DNA结构变化,观察桑叶多糖对肠道微生物失调小鼠的调整作用。

1 实验材料

1.1 实验动物

昆明种小鼠25只,全雄,体质量20~25 g。由天津市山川红实验动物科技有限公司提供,合格证号SCXK(津)2011-0001。饲养于18~220℃清洁级动物实验室内。

1.2 主要试剂

乳酶生片(批号110605,桂林南药股份有限公司);盐酸林可霉素针剂(批号100301,天津金耀氨基酸有限公司)。DNA快速纯化/回收试剂盒(批号112092,北京康为世纪生物科技有限公司)。粪便基因组提取试剂盒基因引物委托北京天一辉远生物科技有限公司合成。桑叶药材经天津中医药大学李天祥副教授鉴定为桑科植物桑 *Morus alba* L.的干燥叶。乙醇为食品级,三氯乙酸为分析纯试剂。

1.3 仪器

涡旋混匀机(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),HH-2数显恒温水浴锅(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司),LDZ5-2离心机(北京医用离心机厂)。

2 方法和结果

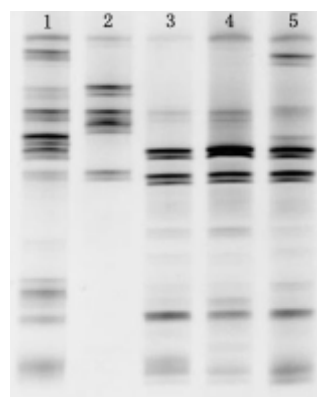
2.1 桑叶多糖的制备^[3]

称取桑叶药材适当粉碎,加入10倍量水,煎煮2 h,2次,滤液减压浓缩,浓缩液上大孔吸附树脂纯化,脱色液添加10%三氯乙酸适量脱蛋白,滤液用95%乙醇沉淀,于冰箱冷藏静置48 h后滤取沉淀得桑叶粗多糖。桑叶粗多糖加水溶解,滤过,弃去少量不溶物,滤液浓缩用乙醇沉淀使含醇量达不同

体积分数,于冰箱冷藏静置48 h后滤取沉淀,沉淀用无水乙醇、丙酮洗涤多次,50℃低温干燥,得3种多糖T1、T2、T3。经Sephadex G-100进一步分段纯化,高效液相凝胶色谱法测定其相对分子质量分布,将不同相对分子质量段的桑叶多糖对糖尿病大鼠进行降血糖实验,实验证明重均相对分子质量 $1.12 \times 10^5 \sim 1.22 \times 10^5$ 的多糖对糖尿病大鼠降血糖作用最佳。因此本实验采用的多糖为重均相对分子质量为 $1.12 \times 10^5 \sim 1.22 \times 10^5$ 多糖。

2.2 盐酸林可霉素诱导小鼠肠道菌群失调模型的建立^[4]

昆明种小鼠 ig 0.30 g/mL 盐酸林可霉素,0.6 mL/次(小鼠每克体质量给药7.2 mg),2次/d,连续5 d。观察腹泻情况。取小鼠粪便,进行气相色谱法测定,跟踪短链脂肪酸乙酸、丙酸、丁酸的变化。见图1。



1-对照组 2-模型组 3-自然恢复组 4-桑叶多糖组 5-乳酶生组
1-control group 2-model group 3-spontaneous recovery group
4-polysaccharide group 5-lactasin group

图1 小鼠肠道菌群DGGE图谱

Fig. 1 DGGE of intestinal flora in mice

由图1可以看出,对照组小鼠的肠道菌群种类最为丰富,造模后的小鼠肠道菌群有了明显改变,菌群数量减少。这个结果与徐灵筠等^[5]将健康小鼠进行糖尿病造模后观察到的肠道菌群失衡的结果一致。小鼠出现腹泻现象。气相色谱法检测小鼠粪便中的短链脂肪酸乙酸、丙酸、丁酸,对应的出峰时间没有出峰^[6]。提示小鼠造模成功。

2.3 分组与给药

将造模成功的22只小鼠随机分为桑叶多糖组8只、乳酶生组7只、模型组7只,另设置对照组5只。桑叶多糖组小鼠 ig 6.0 mg/mL 多糖溶液0.6 mL

(此用量依据前期实验降糖效果最佳量, 0.144 mg/g), 乳酶生组小鼠 ig 5.5 mg/mL 乳酶生片混悬液 0.6 mL (0.132 mg/g), 2 次/d, 连续给药 7 d。模型组、对照组小鼠自行饮水。

2.4 肠道菌 DNA 的提取

分别取对照组、模型组和桑叶多糖组小鼠的新鲜粪便 0.2 g, 利用粪便提取试剂盒 (Stool Gen DNA Kit, CWBIO) 提取粪便基因组, 提取的基因组保存在 -80 °C 冰箱内, 备用。

2.5 DNA 序列的扩增

用于分析的 DNA 序列扩增的是 16S 段的扩增, 采用带 GC 夹板的引物 F-968-GC/R-1401 (F-968-GC: 5'-CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGAACGCGAACCTTAC-3'; R-1401: 5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3'), 反应体系为 50 μ L, 包括 5 μ L 10 $\times$ Buffer、4 μ L dNTP Mixture (各 10 mmol/L)、2 μ L 正向引物 (10 μ mol/L)、2 μ L 反向引物 (10 μ mol/L)、20 ng DNA 模板和 0.5 U Taq DNA 聚合酶。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 终止。

2.6 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 法分析^[7]

利用 Dcode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad) 进行 DGGE 分析。DGGE 条件为: 6% 聚丙烯酰胺凝胶, 40%~60% 变性剂浓度范围 (100% 变性剂为 7 mol/L 尿素和 40% 去离子甲酰胺的混合物), DNA 上样量为 200 ng, 缓冲液为 1 $\times$ TAE, 60 °C 恒温, 160 V 恒压条件下电泳 4 h。电泳结束后, 用 10 mg/mL EB 染色 30 min, 用 1 $\times$ TAE 脱色 15 min, 通过 Bio-Rad 凝胶成像系统成像, Quantity One 软件对图像进行分析。比对各条带及样品, 进行聚类分析, SPSS 16.0 软件对各组小鼠肠道微生物群落结构进行主成分分析。

2.6.1 DGGE 直观图分析 以造模第 5 天小鼠粪便的 DNA 作为模型组; 模型组没给药 5 d 后, 相当于自然恢复的 DNA 作为自然恢复组。比较对照组、模型组、自然恢复组、桑叶多糖组以及乳酶生组的 DGGE 图谱, 见图 1。经过自然恢复、桑叶多糖和乳酶生的作用, 小鼠肠道菌群种类有了明显的增加, 但与对照组小鼠的肠道菌群比较仍然有差别, 并不能完全恢复到原来的水平。

2.6.2 聚类分析 在 7 d 的作用或自然恢复之后, 小鼠的肠道菌群可以达到基本的修复, 样品的聚类

分析结果见图 2。可以看出, 与对照组最接近的是乳酶生组, 其次是桑叶多糖组, 最后是自然恢复组。乳酶生组恢复的稍好一些, 在作用或恢复 7 d 后, 小鼠通过自身的代谢系统可以恢复一些。由于实验没有在作用及恢复期间进行跟踪监测, 所以无法确定多糖是否可以帮助小鼠比其自然恢复所用的时间缩短。

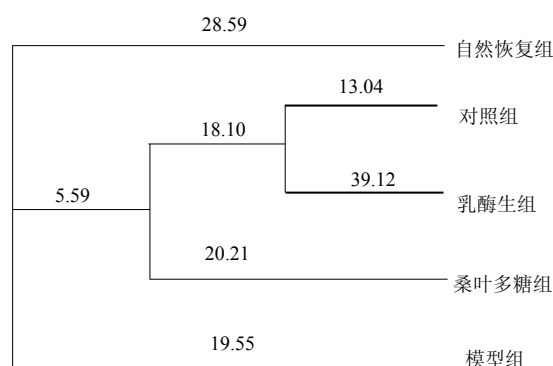


图 2 样品的聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of samples

2.6.3 菌群落结构的主成分分析 从图 3 可以直观地看出, 桑叶多糖、乳酶生组小鼠肠道菌群与对照组关系最近, 在两个水平上都显示出与对照组较近的关系, 自然恢复组仅在一个水平上接近对照组, 模型组与对照组肠道菌群及其他组肠道菌群的差异明显。结果进一步更加直观的说明, 桑叶多糖对小鼠肠道菌群有一定的调节作用。

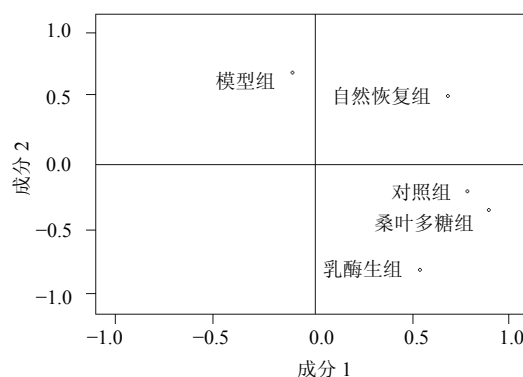


图 3 样品菌群结构的 PCA 分析

Fig. 3 PCA analysis of microflora in samples

3 讨论

目前抗菌药物是最常见引起肠道菌群失调的诱因。抗菌药使用后将肠道内敏感菌大量杀死, 各菌种间的比例发生较大幅度的变化而超出正常范围的

状态,特别是原籍菌的数量和密度下降,外籍菌和环境菌的数量和密度升高^[8]。抗菌药物所致的肠道菌群失调的主要表现为腹泻。本实验应用盐酸林可霉素灌胃造模后的小鼠肠道菌群有了明显改变,菌群数量减少,挥发性脂肪酸含量显著降低。这些变化充分证明肠道菌群失调小白鼠模型是可靠的。

本实验采用 DGGE 分析的分子生物学方法是依赖于细菌的 16S rDNA 来进行小鼠肠道菌群的分析,16S rRNA 是细菌的系统分类研究中最有用的和最常用的分子钟,其种类少、含量大(约占细菌 RNA 含量的 80%)、分子大小适中等,因此目前很多研究直接使用 16S rRNA 编码基因(16S rDNA)作为靶序列。DGGE 法可以很好地直观反映出各组小鼠肠道菌群的变化以及各组之间的比较。但不能更加全面系统的在肠道菌群结构方面给出数据,明确细菌种属的变化,还需做 16S rDNA 克隆文库分析,两种方法相互补充,使得分析更加全面而具体。

桑叶多糖在治疗糖尿病方面的作用已经越来越受到认可和关注^[9]。本实验通过 DGGE 法证明桑叶多糖在调节肠道菌群方面确实有一定的效果,这为桑叶多糖通过调肠道菌群增加益生菌数量,进而增加肠道内益生元,从而达到治疗糖尿病的假设提供实验依据。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 赵 骏, 高 岚. 桑叶多糖的降糖降脂作用 [J]. 天津中医药, 2004, 21(6): 505-506.
- [3] 赵 骏, 方 玲, 于坤路, 等. 桑叶多糖不同分子量段降血糖作用研究 [J]. 中药材, 2010, 33(1): 108-110.
- [4] 胡新俊, 李春香, 王 广, 等. 马齿苋多糖对肠道菌群微生态失调小鼠的调整作用研究 [J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(9): 781-783.
- [5] 徐灵筠, 赵琴丽, 庞小燕, 等. ERIC-PCR 指纹图谱技术分析糖尿病小鼠肠道细菌群落变化 [J]. 中国微生态学杂志, 2007, 19(4): 324-326.
- [6] 王菱枝, 赵 骏, 黄 灿, 等. 桑叶活性多糖调整小鼠肠道菌群失调的研究 [J]. 中外健康文摘, 2013, 10(1): 41-43.
- [7] Nübel U, Engelen B, Felske A, et al. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis [J]. *J Bacteriol*, 1996, 178(19): 5636-5643.
- [8] 陶方明. 人体的微生态平衡 [J]. 检验医学与临床, 2007, 4(3): 204-205.
- [9] 陈建国, 步文磊, 来伟旗, 等. 桑叶多糖降血糖作用及其机制研究 [J]. 中草药, 2011, 42(3): 515-520.