

实时荧光定量PCR联合高通量测序分析杠柳毒苷与三七总皂苷配伍对大鼠肠道菌群的影响

李 丽¹, 马文娟¹, 贾 琪¹, 欧阳慧子², 常艳旭¹, 何 俊^{1*}

1. 天津中医药大学 天津市现代中药重点实验室, 天津 300193

2. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193

摘要: 目的 采用实时荧光定量PCR (qRT-PCR) 法和Illumina高通量测序技术研究杠柳毒苷和不同比例三七总皂苷配伍对大鼠肠道菌群的影响。方法 将15只SD大鼠随机分为杠柳毒苷单独给药组(A组)、杠柳毒苷和低剂量三七总皂苷配伍组(B组)、杠柳毒苷和高剂量三七总皂苷配伍组(C组), 每组5只。按杠柳毒苷10 mg/kg、三七总皂苷0.74和2.22 g/kg (分别相当于香加皮与三七的配伍比例为1:1和1:3)的剂量ig给药, 连续给药7 d。给药结束后收集大鼠粪便, 进行qRT-PCR反应和高通量测序。结果 qRT-PCR结果表明, 与杠柳毒苷单独给药组比较, 杠柳毒苷和三七总皂苷配伍后, 总菌、拟杆菌的相对含量显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), 而乳酸杆菌的相对含量呈现降低的趋势; Illumina高通量测序结果显示, 在微生物群落结构上, 杠柳毒苷配伍三七总皂苷后, 拟杆菌的相对丰度明显升高而乳酸杆菌的相对丰度呈现降低的趋势; 在肠道菌群多样性上, 3组样品的多样性指数间无显著性差异。结论 杠柳毒苷和不同比例的三七总皂苷配伍后, 可对大鼠肠道中的总菌、乳酸杆菌及拟杆菌产生一定影响, 但对肠道菌群多样性的影响不明显。

关键词: 杠柳毒苷; 三七总皂苷; 高通量测序; 实时荧光定量PCR; 肠道菌群; 乳酸杆菌; 拟杆菌

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2019) 03-0432-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.03.009

Compatibility of periplocin and *Panax notoginseng* saponins on intestinal flora in SD rats by Real-time fluorescence quantitative PCR and High-throughput sequencing

LI Li¹, MA Wenjuan¹, JIA Qi¹, OUYANG Huizi², CHANG Yanxu¹, HE Jun¹

1. Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin, 300193, China

Abstract: Objective To study the influence of combination of *Panax notoginseng* saponins (PNS) and periplocin on intestinal flora in rats by using Illumina high-throughput sequencing and Real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). **Methods** Fifteen SD rats were randomly divided into three groups: the periplocin single administration group (group A), compatibility group of periplocin and low dose PNS (group B), compatibility group of periplocin and high dose PNS (group C). Periplocin 10 mg/kg, PNS 0.74 and 2.22 g/kg (corresponding to the compatibility ratio of *Periplocae Cortex* and *Panax notoginseng* 1:1 and 1:3, respectively) were administered by ig for seven days. After seven days of administration, the fecal samples were collected and analyzed by qRT-PCR and Illumina high-throughput sequencing. **Results** The qRT-PCR results showed that the bacterium number of total gut bacteria and *Bacteroidetes* were significantly increased ($P < 0.05$ and 0.01), while the relative content of *Lactobacillus* was decreased in the combination group, compared with Periplocin group. Illumina high-throughput sequencing results showed that, in terms of microbial community structure, the relative abundance of *Bacteroides* was increased significantly and that of *Lactobacillus* was decreased after the combination of periplocin and PNS, and there was no significant difference in the diversity index of intestinal flora among three groups. **Conclusion** The compatibility of periplocin and PNS in different ratios has some effect on gut flora of rats to some extent,

收稿日期: 2018-11-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81673824, 81503457)

第一作者: 李 丽(1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药分析。Tel: (022)59596163 E-mail: Lilytjutcm@163.com

*通信作者: 何 俊(1981—), 男, 博士研究生导师, 副研究员, 研究方向为药物分析研究。Tel: (022)59596163 E-mail: hejun673@163.com

but has little effect on diversity of intestinal flora.

Key words: periplocin; *Panax notoginseng* saponins; high-throughput sequencing; qReal-time PCR; intestinal flora; *Lactobacillus*; *Bacteroides*

香加皮为萝藦科植物杠柳 *Periploca sepium* Bge. 的干燥根皮,具有祛风湿、强筋骨等的功效,临床上常用于治疗急、慢性充血性心力衰竭^[1]。香加皮提取物具有较显著的抗肿瘤活性^[2-4],所含杠柳毒苷既为有效成分^[5],又为有毒成分^[6]。三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 为五加科植物,具有止血散瘀、消肿定痛的功效。三七总皂苷是三七的主要药效物质,对血液系统、心脑血管系统、中枢神经系统等具有广泛的药理作用^[7-8]。

研究表明,杠柳毒苷作为香加皮的主要有效/有毒成分,经肠道菌群作用后,可在体内发生代谢转化^[9-11];其经三七总皂苷配伍后,可降低毒副作用^[12]。本研究采用高通量测序技术分析大鼠肠道菌群的结构特征,同时建立了大鼠粪便中总菌、乳酸杆菌和拟杆菌的实时荧光定量PCR(qRT-PCR)的检测方法,初步研究杠柳毒苷和三七总皂苷配伍减毒的作用机制。

1 材料

1.1 主要仪器

CFX96™实时荧光定量PCR仪(Bio-Rad公司);e-spect超微量核酸分析仪(Malcom公司);低温离心机(Thermo公司);电热恒温水浴锅(天津泰斯特仪器有限公司)。

1.2 药物与主要试剂

杠柳毒苷(批号DST170907-041,质量分数≥98%)、三七总皂苷(批号DST170815,人参皂苷Rb₁、Rd、Re、Rg₁和三七皂苷R₁总质量分数≥73.91%),均购自成都德思特生物技术有限公司;柱式粪便DNAout(北京天恩泽基因科技有限公司);PCR引物(上海生工生物工程股份有限公司);FastStart Universal SYBR® Green Master (ROX) (Roche公司,批号24759100);氯仿(天津康科德科技有限公司)。

1.3 实验动物

SPF级健康SD雄性大鼠15只,体质量220~250 g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,实验动物许可证号SCXK(京)2014-0004。

2 方法

2.1 分组及给药

依据前期药动力学研究结果^[13],将15只SD大鼠

随机分为杠柳毒苷单独给药组(A组)、杠柳毒苷和低剂量三七总皂苷配伍组(B组)、杠柳毒苷和高剂量三七总皂苷配伍组(C组),每组5只。按杠柳毒苷10 mg/kg、三七总皂苷0.74和2.22 g/kg(分别相当于香加皮与三七的配伍比例为1:1和1:3)的剂量ig给药,连续给药7 d。

2.2 粪便样本采集

连续给药7 d后采用代谢笼收集大鼠的粪便样本,实验结束后将大鼠粪便置于无菌离心管中,并迅速置于-80℃冰箱保存,用于提取基因组总DNA。

2.3 粪便细菌DNA的提取

取“2.2”项样本,严格按照柱式粪便DNAout试剂盒的操作步骤提取粪便中细菌基因组DNA,提取得到的DNA经核酸分析仪进行纯度和浓度检测后放置于-20℃冰箱保存备用。

2.4 qRT-PCR实验

应用引物设计软件Primer 5.0设计qRT-PCR所需相关特异性引物,交由上海生工生物技术服务公司合成(见表1)。

表1 qRT-PCR引物序列

Table1 Primer sequence of qRT-PCR

细菌	引物序列(5'-3')
总菌	正向 5'-TCCTACGGGAGGCAGCAGT-3'
	反向 5'-GGACTACCAGGTATCTAATCCTGTT-3'
乳杆菌	正向 5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3'
	反向 5'-CGCCACTGGTGTTCYTCCATATA-3'
拟杆菌	正向 5'-CACGAAGAACTCCGATTG-3'
	反向 5'-CACTTAAGCCGACACCT-3'
GAPDH	正向 5'-GACAACTTTGGCATCGTGGA-3'
	反向 5'-ATGCAGGGATGATGTTCTGG-3'

qRT-PCR反应采用25 μL反应体系,包括“2.3”项下所提取的DNA为模板,每例模板2.5 μL,ROX 12.5 μL,PCR上下游引物各0.25 μL以及9.5 μL去离子水补足体积。反应条件为:95℃ 15 s,60℃ 1 min,循环40次。各种细菌特异性引物及内参引物扩增得到的C_t值,采用2^{-ΔΔC_t}法计算得到3种细菌在各组中的相对含量。

2.5 Illumina 高通量测序技术

取“2.3”项所提取的粪便中基因组总 DNA, 采用 Illumina MiSeq 测序平台, 对 16S rRNA 基因的 V4 高变区进行测序分析。

2.6 统计学方法

应用 GraphPad Prism 5.0 软件对数据进行分析作图, 采用 SPSS 17.0 软件对实验中所获得的数据进行单因素方差分析, 比较不同组间的差异。

3 结果

3.1 qRT-PCR 结果分析

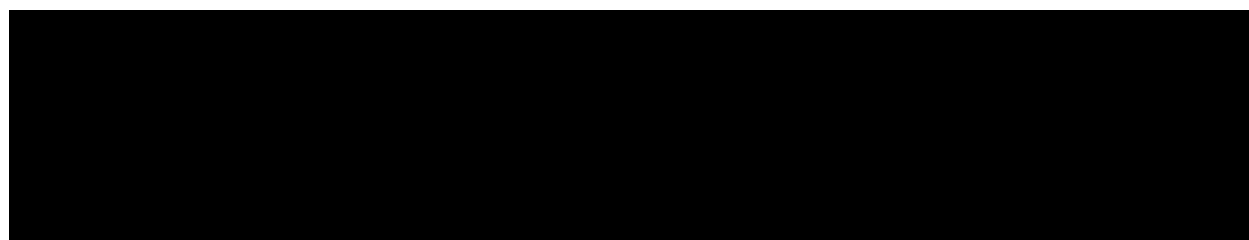
图 1 为 qRT-PCR 检测后 A、B、C 3 组中总菌、乳酸杆菌、拟杆菌的相对含量。与 A 组比较, B 组总菌及拟杆菌的相对含量均显著升高而乳酸杆菌相对含量显著降低 ($P < 0.05, 0.01$); C 组表现为总菌及拟杆菌的相对含量均显著升高 ($P < 0.01$), 而乳酸杆菌相对含量降低但差异不显著。

qRT-PCR 结果表明, 杠柳毒苷和三七总皂苷配

伍后可使总菌、拟杆菌的相对含量显著升高; 使乳酸杆菌的相对含量呈现降低的趋势。

3.2 高通量测序结果分析

3.2.1 菌群多样性分析 3 组大鼠粪便菌群的多样性指数见表 2。OUT, 即操作分类单元, 是人为给某一个分类单元(品系、种、属、分组等)设置的同一标志, 数值越大表示分类越多、多样性越高; ACE、Chao1 指数对菌群丰度进行评估, 数值越大表示菌群丰富程度越高; Simpson、Shannon 指数对菌群多样性进行评估, 数值越大表示群落多样性越高。由表 2 可见, 3 组大鼠粪便菌群测序覆盖深度(coverage 指数)均在 0.99 以上, 说明样品中序列未被测到的概率较低。与 A 组比较, B 组和 C 组大鼠肠道菌群的 OTU、ACE、Chao1、Simpson 和 Shannon 指数无统计学差异。结果提示, 不同比例的三七总皂苷配伍杠柳毒苷后对大鼠肠道菌群多样性无显著影响。



与 A 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs group A

图 1 qRT-PCR 分析不同组中总菌、乳杆菌和拟杆菌的相对含量 ($\pm s, n = 5$)

Fig. 1 Analysis of relative content of total gut bacteria, Lactobacillus and Bacteroides in different groups by qRT-PCR ($\pm s, n = 5$)

表 2 各组样品微生物丰度及多样性比较 ($\pm s, n = 5$)

Table 2 High-throughput sequencing data summary ($\pm s, n = 5$)

组别	OTU	ACE	Chao1	Simpson	Shannon	Coverage
A	749.8 $\pm$ 144.5	772.3 $\pm$ 134.8	758.5 $\pm$ 109.6	0.9126 $\pm$ 0.0458	5.43 $\pm$ 1.01	0.9974 $\pm$ 0.0005
B	675.0 $\pm$ 75.0	690.9 $\pm$ 71.6	692.3 $\pm$ 54.8	0.9472 $\pm$ 0.0166	5.91 $\pm$ 0.37	0.9974 $\pm$ 0.0005
C	806.8 $\pm$ 474.2	830.3 $\pm$ 478.0	829.6 $\pm$ 469.1	0.8752 $\pm$ 0.0935	4.92 $\pm$ 1.37	0.9972 $\pm$ 0.0016

3.2.2 微生物群落结构分析 在门(Phylum)水平上, 共检测出 10 个菌门, 如图 2 所示。3 组样品的粪便菌群均以厚壁菌门 Firmicutes、拟杆菌门 Bacteroidetes、变形菌门 Proteobacteria、疣微菌门 Verrucomicrobia 和放线菌门 Actinobacteria 为主, 这 5 种菌门在 3 组中所占的比例分别为 99.59%、99.33% 和 99.29%。比较 3 组样品的菌群组成可见, B、C 组拟杆菌门的相对丰度均高于 A 组, 而变形菌

门含量则相反, A 组含量较高。

在属(Genus)水平上, 共检测 30 个菌属, 如图 3 所示, 3 组样品的粪便菌群均以乳杆菌属-厚壁菌门 Lactobacillus、大肠埃希菌-志贺氏菌属-变形菌门 Escherichia - Shigella、拟杆菌属-拟杆菌门 Bacteroides 丰度较高, 这 3 种菌属在 3 组中所占的比例分别为 36.46%、28.79%、38.18%。乳酸杆菌属在 A 组中的相对丰度明显高于 B、C 组, 而拟杆菌属含

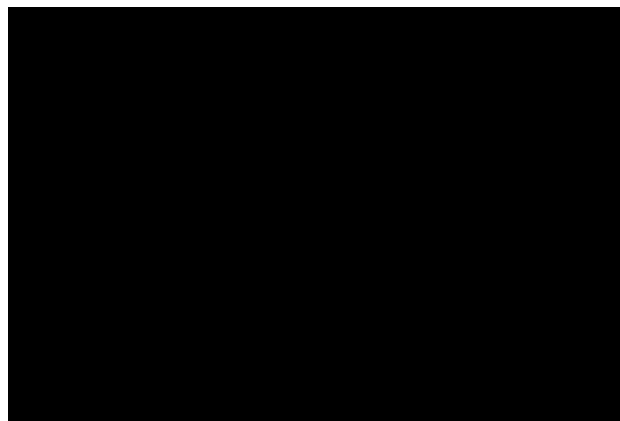


图2 3组大鼠粪便菌群在门水平上的相对丰度
Fig. 2 Relative abundance of bacterial phyla in microbiota of three groups. (Others represent unclassified bacteria)

量则相反,A组较低。

通过采用高通量测序技术对大鼠肠道菌群多样性进行分析,并对所获得的数据运用单因素方差分析,发现3组样品的多样性指数间无显著性差异。由微生物群落结构分析可知,配伍三七总皂苷后,拟杆菌的相对丰度明显升高而乳酸杆菌的相对丰度呈现降低的趋势,此结果与PCR中拟杆菌和乳酸杆菌的检测结果具有一致性。

4 讨论

肠道菌群的微生态平衡与宿主健康状态密切相关,很多疾病的发生发展都伴随着肠道菌群的变化,故可通过调节肠道菌群结构缓解某些疾病。研究表明,中药对肠道菌群的平衡产生影响;同时,肠道内的微生物对中药的代谢发挥着重要作用。中

药一般以口服形式进入体内,其很多成分(如水溶性的苷类成分)都是经过肠菌作用后,才被吸收入体内而发挥药效^[14]。合理的中药配伍用药可通过各种途径恢复肠道菌群结构,从而达到治疗某些疾病的目的。因此,肠道菌群对于阐明中药的作用机制起着至关重要的作用。

本实验通过qRT-PCR法和Illumina高通量测序技术研究杠柳毒苷和不同比例三七总皂苷配伍对大鼠肠道菌群的影响,结果表明,杠柳毒苷与三七总皂苷配伍用药后可引起总菌、拟杆菌的相对含量显著升高而乳酸杆菌的相对含量呈现降低的趋势,两种方法表现出良好的一致性。拟杆菌门在动物胃肠道中是优势菌门^[15],本试验中配伍组总菌和拟杆菌属细菌数的增加,在一定程度上反应了三七总皂苷的减毒作用,从调节肠道菌群的角度初步揭示了二者配伍用药的作用机制。

本研究结果提示,三七总皂苷与杠柳毒苷配伍使用可对大鼠肠道中的总菌、乳酸杆菌及拟杆菌产生一定影响。此结果为进一步研究香加皮与三七配伍减毒的作用机制提供了理论依据。

参考文献

- [1] 杨虹,刘虹,任晓亮,等. 香加皮抗心力衰竭有效部位的制备工艺研究[J]. 天津中医药大学学报, 2011, 30(3): 169-171.
- [2] 刘洋,刘虹,王小莹,等. 香加皮不同提取部位体外抗肿瘤活性实验研究[J]. 天津中医药, 2008, 25(2): 153-156.
- [3] 张静,杨光,赵学涛,等. 香加皮杠柳苷对人肺癌QG56

图3 3组大鼠粪便菌群在属水平上相对丰度

Fig. 3 Relative abundance of bacterial genus in microbiota of three groups (Others represent unclassified bacteria)

- 细胞抑制作用的研究 [J]. 天津医药, 2014, 42(3): 197-199, 290.
- [4] 李磊, 赵连梅, 崔雯萱, 等. 香加皮杠柳苷通过溶酶体途径诱导胃癌 MGC-803 细胞凋亡 [J]. 肿瘤防治研究, 2016, 43(5): 335-339.
- [5] 张伯礼, 高秀梅, 刘虹, 等. 一种治疗急、慢性充血性心力衰竭的药物组合物及制备方法和应用 [P]. 中国: CN1817360. 2006-08-16.
- [6] 毕波, 周昆, 胡利民. 香加皮及其主要毒性成分的研究进展 [J]. 毒理学杂志, 2010, 24(1): 73-75.
- [7] 杨琳, 林万程, 施家乐. 三七总皂苷药理作用的研究进展 [J]. 安徽医药, 2014, 18(5): 963-964, 965.
- [8] 贺旭, 刘英飞, 王伟, 等. 三七总皂苷对全脑缺血大鼠海马脑水肿及 GFAP 表达的影响 [J]. 中草药, 2017, 48(22): 4695-4700.
- [9] Yan K J, Wang X Y, Jia Y M, et al. Quantitative determination of periplocymarin in rat plasma and tissue by LC-MS/MS: application to pharmacokinetic and tissue distribution study [J]. Biomed Chromatogr, 2016, 30(8): 1195-1201.
- [10] He J, Bo F, Tu Y R, et al. A validated LC-MS/MS assay for the simultaneous determination of periplocin and its two metabolites, periplocymarin and periplogenin in rat plasma: Application to a pharmacokinetic study [J]. J Pharm Biomed Anal, 2015, 114: 292-295.
- [11] 任晓亮, 谢跃生, 潘桂湘, 等. 香加皮强心成分杠柳毒苷肠菌代谢研究 [J]. 天津中医药, 2007, 24(6): 515-518.
- [12] 高秀梅, 刘虹, 周昆, 等. 含有人参皂苷和杠柳毒苷的药物组合物及其用途 [P]. 天津: CN101502530, 2009-08-12.
- [13] 刘华明, 李丽, 马文娟, 等. 三七总皂苷对杠柳毒苷药代动力学的影响 [J]. 天津中医药, 2018, 35(7): 539-542.
- [14] Park E K, Shin J, Bae E A, et al. Intestinal bacteria activate estrogenic effect of main constituents puerarin and daidzin of *Pueraria thunbergiana* [J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29(12): 2432-2435.
- [15] Qin J J, Li R Q, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing [J]. Nature, 2010, 464(7285): 59-65.