

千金子制霜前后提取物对大鼠肠道菌群的影响

孙振阳, 王英姿*, 聂瑞杰, 骆声秀, 李文华, 张 瑜, 张景珍, 王思雨

北京中医药大学, 北京 100102

摘要:目的 研究千金子制霜前后提取物对正常大鼠肠道菌群的影响, 为进一步阐明千金子制霜减毒机制提供参考。方法 大鼠 ig 高、中、低剂量的千金子生品和霜品提取物, 采用平板菌落计数法考察千金子制霜前后大鼠粪便中 4 类代表性肠道菌群双歧杆菌、乳酸杆菌、大肠杆菌、肠球菌的数量变化。**结果** 平板菌落计数实验结果表明, ig 千金子生品与霜品提取物后大鼠出现菌群失调现象, 且千金子霜品较生品引起的菌群紊乱程度低, 在低剂量给药时可使条件致病菌肠球菌和大肠杆菌的数量减少。**结论** 千金子制霜前后提取物均会影响肠道菌群的生物多样性, 影响肠道菌群平衡, 且千金子制霜后对 4 类肠道菌群的作用减弱, 引起肠道菌群紊乱程度减小, 这与千金子霜品泻下作用缓和的研究结果相一致, 表明从肠道微生态角度考察千金子制霜前后对肠道菌群的干预作用, 可揭示制霜与肠道菌群数量变化可能存在相关性。

关键词: 千金子; 千金子霜; 制霜减毒; 双歧杆菌; 乳酸杆菌; 大肠杆菌; 肠球菌; 肠道菌群

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)21-4493-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.21.020

Effect of *Semen Euphorbiae* and *Semen Euphorbiae Pulveratun* extracts on intestinal flora in rats

SUN Zhen-yang, WANG Ying-zi, NIE Rui-jie, LUO Sheng-xiu, LI Wen-hua, ZHANG Yu, ZHANG Jing-zhen, WANG Si-yu

Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract: Objective To study the effect of *Semen Euphorbiae* and *Semen Euphorbiae Pulveratun* on the microflora in rats gastrointestinal from the aspect of the intestinal microecology, so as to provide reference for further revealing mechanism of the attenuation after processing of *Semen Euphorbiae*. **Methods** Rats were fed with high, medium and low dose of *Semen Euphorbiae* and *Semen Euphorbiae Pulveratun*, and the plate-counter method was used to examine the four types of intestinal flora in the feces of rats which are *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus*. **Results** After intragastric administration, the rat had the alteration of intestinal flora, and the degree of alteration of intestinal flora in the *Semen Euphorbiae Pulveratun* group was lower than the group of *Semen Euphorbiae*. In the low doses of group, the number of *Enterococci* and *Escherichia coli* was decreased. **Conclusion** *Semen Euphorbiae* and *Semen Euphorbiae Pulveratun* could affect the intestinal microbial diversity and the balance of intestinal flora. The effect of *Semen Euphorbiae Pulveratun* on four kinds of intestinal flora was weakened, and the degree of intestinal flora disturbance was reduced, which was consistent with the results of alleviation of the effect of *Semen Euphorbiae Pulveratun*. It was suggested that the intervention effect of *Semen Euphorbiae* on intestinal microflora could be clarified from the perspective of intestinal microecology, which could reveal possible correlation between *Semen Euphorbiae Pulveratun* and the changes of intestinal flora.

Key words: *Semen Euphorbiae*; *Semen Euphorbiae Pulveratun*; frost reduction and toxicity; *Bifidobacterium*; *Lactobacillus*; *Escherichia coli*; *Enterococcus*; intestinal microecology

千金子为大戟科植物续随子 *Euphorbia lathyris* L. 的干燥成熟种子, 味辛, 性温, 有毒, 具有泻下逐水、破血消癥、疗癣蚀疮的功效, 用于二便不通、

水肿、痰饮、积滞胀满、血瘀经闭, 外治顽癣、疣赘等^[1]。古代临床应用和现代药理研究表明千金子制霜可缓和其泻下作用, 降低毒性^[2-4], 但其制霜减

收稿日期: 2017-05-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81673597)

作者简介: 孙振阳 (1993—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向为中药制剂新技术与炮制原理研究。Tel: (010)84738615 E-mail: 1226224696@qq.com

*通信作者 王英姿 (1975—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药制剂新技术与炮制原理研究。

Tel: (010)84738615 E-mail: wangyzi@sina.com

毒的作用机制尚不完全清楚。

现代医学研究认为,正常菌群在人体的生命活动中起着非常重要的作用。人体肠道内存在数量庞大、组成复杂的正常菌群,对宿主具有营养、免疫和生物拮抗等多种作用。在正常情况下,肠道菌群处于平衡状态,是机体健康的保证和象征^[5-6]。近年来研究发现,泻下类中药因含有刺激性成分,对肠道内的益生菌具有抑制作用,造成肠道菌群紊乱^[7-8]。经检索未见千金子对大鼠肠道菌群影响的研究报道。因此,本实验通过检测大鼠粪便中的双歧杆菌、乳酸杆菌、大肠杆菌和肠球菌的数量变化,初步探讨千金子制霜前后提取物对正常大鼠肠道菌群的影响,从肠道微生态的角度为进一步阐明千金子制霜减毒机制提供参考。

1 材料

1.1 药品与试剂

千金子饮片(用于制备千金子生品和霜品提取物)购自安徽亳州沪谯中药饮片厂(批号 1203070692,产地江西),经北京中医药大学刘春生教授鉴定为大戟科植物续随子 *Euphorbia lathyris* L. 的干燥成熟种子。千金子生品和霜品提取物为实验室自制^[9](脂肪油量分别为 56.7%和 19.5%);0.9%氯化钠注射液(石家庄四药有限公司,批号 1701023203);莫匹罗星锂盐添加剂(HB0384-6a)、MRS 培养基、乳酸杆菌选择性琼脂、大肠杆菌显色培养基、肠球菌琼脂均购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。大肠杆菌成套(新国标)生化鉴定试剂盒、革兰氏染色液试剂盒、硝酸盐还原试剂盒均购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;羧甲基纤维素钠(批号 0903012,汕头市西陇化工厂有限公司)。

1.2 实验动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 42 只,体质量(220±20)g,购自斯贝福实验动物科技有限公司,动物合格证号 SCXK(京)2016-0002。

1.3 仪器

BT125D 电子天平(北京赛多利斯有限公司);KC/HW-100L 恒温恒湿箱(上海一恒科学仪器有限公司);SW-CJ 洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);RJ-LDL-50G 低速大容量多管离心机(无锡瑞江分析仪器有限公司);MLS-3750 全自动高压蒸汽灭菌器(日本 Sanyo 公司);2.5 L 圆底立式厌氧培养袋(青岛高科技工业园海博生物技术有限公司);

Research plus 单道可调量程移液器(德国 Eppendorf 公司);32-0072B-138 显微镜(日本 Nikon)。

2 方法

2.1 动物分组及给药

将健康 SD 大鼠适应性喂养 3 d 后,按体质量随机分为 7 组,即对照组,千金子生品低、中、高剂量组,千金子霜品低、中、高剂量组,每组 6 只。

在自由饮食和饮水的基础上,每日 ig 给药 1 次。千金子生品、霜品提取物用 0.5%羧甲基纤维素钠配制成 0.363 125、0.726 250、1.452 500 g/mL 的溶液,各组每日 ig 体积为 10 mL/kg,即高、中、低剂量组每日给药剂量为 3.631 250、7.262 50、14.525 00 g/kg,连续给药 9 d。

2.2 观察指标

2.2.1 大鼠体质量测定 分别于给药第 0、3、6、9 天同一时间点对各组大鼠称定体质量。

2.2.2 粪样收集及稀释 分别于给药前和给药后 0、9 d,按摩大鼠腹部促其排便,将粪便装入灭菌的 EP 管中,立即置于-20℃冰箱保存,备用。

取出样品在 4℃解冻,时间不超过 18 h。于超净台中取各组大鼠粪便 0.1 g,置于装有适量无菌玻璃珠的无菌管中,以 1:100 的比例加入无菌生理盐水,置于恒温振荡器中,37℃、120 r/min 振摇 30 min 至粪便均质化后,500 r/min 离心 5 min。用灭菌生理盐水将上层粪便悬液依次做 10 倍系列梯度稀释至 1×10^{-6} 。

2.2.3 肠道菌群鉴定及分析 分别取适宜稀释度的菌悬液 100 μ L 滴种在 4 种选择性培养基上,涂匀。双歧杆菌、乳酸杆菌要求在 30 min 内操作完毕,置于厌氧培养袋中在 37℃培养箱中培养 48~72 h 后计数菌落。大肠杆菌和肠球菌在 37℃培养箱中培养 18~24 h 后计数菌落。培养结束之后,以菌落形态、革兰氏染色鉴定细菌,并对 4 种肠道菌进行菌群分析,结果以每克粪便中菌落数的对数 log CFU/g 表示。

2.3 统计学处理

采用 SAS 9.2 软件进行数据统计学分析,所得各项数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,对数据先进行正态性检验,然后进行方差齐性检验,两组数据之间进行独立 *t* 检验,不同组之间采用多组间方差分析。

3 结果

3.1 千金子生品和霜品提取物对大鼠体质量的影响

各组大鼠的初始体质量比较无显著性差异(表 1)。与对照组相比,千金子生品高、中剂量组和千

表 1 各组大鼠体质量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 1 Changes of body weight of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	体质量/g			
		第 0 天	第 3 天	第 6 天	第 9 天
对照	—	222.33±3.12	271.70±1.47	296.07±1.78	297.55±2.36
千金子生品	3.631 25	226.97±4.07	267.05±5.53	285.82±5.27	305.53±3.50
	7.262 50	225.83±2.21	254.82±3.41**	272.80±4.89**	270.47±1.76**
	14.525 00	227.43±1.76	230.58±4.05**	243.43±4.26**	233.13±5.65**
千金子霜品	3.631 25	226.52±2.14	270.38±4.73	285.73±5.14	296.42±5.35
	7.262 50	226.78±2.21	271.75±2.84	279.82±3.08**	290.30±2.95
	14.525 00	225.61±3.78	254.85±5.36*	265.54±4.34**	278.88±5.58*

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

千金子霜品高剂量组大鼠在给药后第 3、6、9 天体质量均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)；千金子霜品中剂量组大鼠在给药后第 6 天体质量显著降低 ($P < 0.01$)，在第 3、9 天无显著性差异。千金子生品和霜品低剂量组大鼠体质量与对照组相比均无显著性差异。

3.2 4 类肠道菌群的鉴定结果

革兰氏染色及生化鉴定结果表明，双歧杆菌为镜检 G⁺，菌体形态多样，呈短杆状、纤细杆状或球形，有弯曲呈弧形、两端大小不一，“V”字形或“Y”字形；乳酸杆菌为镜检 G⁺，形态多样，呈长杆状、弯曲杆状或短杆状；肠球菌为镜检 G⁺，卵圆形，呈双或短链状排列；大肠杆菌为镜检 G⁻，杆状，单个或成对存

在，各种菌的形态见图 1。

3.3 千金子生品和霜品提取物对大鼠肠道乳酸杆菌和双歧杆菌的影响

与对照组相比，千金子生品高剂量组和中剂量组大鼠粪便中双歧杆菌、乳酸杆菌显著减少 ($P < 0.05$ 、 0.01 ，表 2)，千金子生品低剂量组、千金子霜品组双歧杆菌、乳酸杆菌数无显著差异。

与千金子霜品高剂量组相比，千金子生品高剂量组大鼠粪便中双歧杆菌和乳酸杆菌显著减少 ($P < 0.01$)；与千金子霜品中剂量组相比，千金子生品中剂量组大鼠粪便中乳酸杆菌显著减少 ($P < 0.05$)，双歧杆菌无显著性差异；千金子生品低剂量组与千

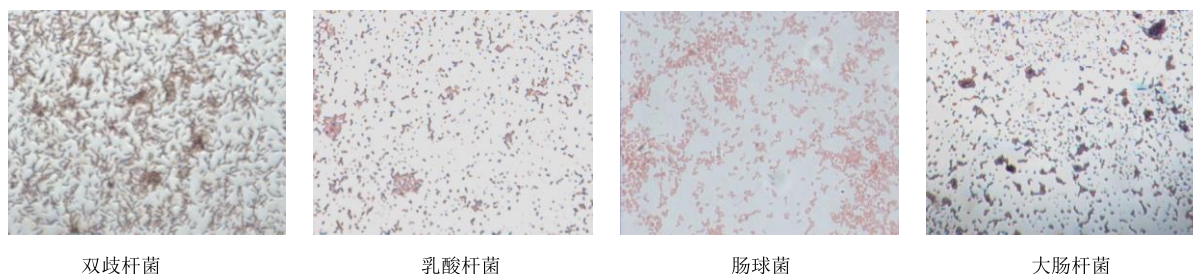


图 1 4 类肠道菌群革兰氏染色结果 (×400)

Fig. 1 Results of Gram stain in four types of intestinal flora (×400)

表 2 千金子生品和霜品提取物对大鼠肠道中双歧杆菌、乳酸杆菌的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 2 Effects of Semen Euphorbiae extraction on Bifidobacterium and Lactobacillus in intestinal tract of rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	双歧杆菌/(logCFU·g ⁻¹)		乳酸杆菌/(logCFU·g ⁻¹)	
		第 0 天	第 9 天	第 0 天	第 9 天
对照	—	8.94±0.47	8.92±0.45	9.01±0.55	8.96±0.47
千金子生品	3.631 25	8.89±0.31	8.91±0.57	9.04±0.38	8.95±0.33
	7.262 50	8.93±0.51	8.83±0.64*	8.97±0.35	8.88±0.64* [△]
	14.525 00	8.90±0.23	7.81±0.65** ^{△△}	8.99±0.29	8.46±0.39** ^{△△}
千金子霜品	3.631 25	8.91±0.59	8.90±0.40	9.03±0.43	8.96±0.28
	7.262 50	8.95±0.44	8.88±0.54	8.98±0.37	8.94±0.35
	14.525 00	8.92±0.42	8.87±0.60	8.99±0.59	8.93±0.50

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ；与对应剂量千金子霜品组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ ，下表同* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs Semen Euphorbiae Pulveratun group of same dosage, same as below table

金子霜品低剂量组相比均无统计学差异。

3.4 千金子生品和霜品提取物对大鼠肠道大肠杆菌和肠球菌的影响

与对照组相比,千金子生品高剂量组大鼠粪便中大肠杆菌和肠球菌显著增加 ($P<0.01$, 表 3),千金子生品中剂量组大鼠粪便中大肠杆菌显著增加 ($P<0.01$),肠球菌略有增加,但无显著性差异。千金子生品和千金子霜品低剂量组的肠球菌、大肠杆

菌数量与对照组相比略有减少,但无统计学差异。

与千金子霜品高剂量组相比,千金子生品高剂量组大鼠粪便中大肠杆菌和肠球菌显著增加 ($P<0.01$);与千金子霜品中剂量组相比,千金子生品中剂量组大鼠粪便中大肠杆菌显著增加 ($P<0.01$),肠球菌略有增加,但无显著性差异;千金子生品低剂量组与千金子霜品低剂量组相比均无显著性差异。

表 3 千金子生品和霜品提取物对大鼠肠道中大肠杆菌、肠球菌变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effects of *Semen Euphorbiae* extraction on *Escherichia coli* and *Enterococcus* in intestinal tract of rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	大肠杆菌/(logCFU·g ⁻¹)		肠球菌/(logCFU·g ⁻¹)	
		第 0 天	第 9 天	第 0 天	第 9 天
千金子生品	3.631 25	7.31±0.39	7.26±0.66	7.59±0.78	7.56±0.75
	7.262 50	7.29±0.44	7.48±0.31**△△	7.56±0.63	7.68±0.79
	14.525 00	7.27±0.45	7.97±0.60**△△	7.57±0.57	8.10±0.47**△△
千金子霜品	3.631 25	7.32±0.40	7.27±0.52	7.60±0.56	7.56±0.65
	7.262 50	7.31±0.34	7.29±0.43	7.60±0.67	7.59±0.59
	14.525 00	7.30±0.41	7.34±0.54	7.58±0.86	7.65±0.51
对照	—	7.31±0.44	7.31±0.46	7.56±0.70	7.60±0.76

4 讨论

肠道菌群是中药毒、效作用研究的重要对象,对口服中药药效作用的发挥起着重要作用,同时中药也有着调理肠道微生态平衡以及影响肠道菌群数量和菌群种类的作用。因此,在疾病治疗的过程中二者既相互作用又相互影响^[10]。

本实验从肠道菌群靶点出发,采用平板菌落计数法探究千金子制霜前后提取物对 4 类代表性肠道菌群数量和生长情况的影响,考察其对肠道微生态平衡的干预作用。结果表明,ig 千金子生品与霜品提取物后,大鼠粪便中主要菌群双歧杆菌、乳酸杆菌、大肠杆菌和肠球菌存在差异,构成肠道屏障的双歧杆菌、乳酸杆菌减少,肠蠕动过快影响肠道菌群比例,肠道菌群多样性减少,正常菌群结构被破坏,出现菌群失调现象,且千金子制霜后引起的菌群紊乱程度较生品降低,在低剂量给药时肠球菌和大肠杆菌的数量减少,即一定剂量下千金子生品和霜品提取物对以上 4 类代表性肠道菌群均有抑制作用,提示千金子低剂量给药时可能对肠道菌群平衡有调节作用,具体的原因和机制还需借助其他现代分子生物学技术进行进一步探究。千金子霜品对 4 类代表性肠道菌群的作用减弱,所引起肠道菌群紊乱程度减小,与千金子制霜后泻下作用缓和的研

究结果一致,进一步阐释了制霜减毒的作用机制。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 宋卫国, 孙付军, 张 敏, 等. 千金子和千金子霜及其主要成分泻下作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2010, 26(4): 40-42.
- [3] 曹艳花. 千金子饮片炮制规范化实验研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2003.
- [4] 孙付军, 宋卫国, 李英霞. 千金子及不同含油量千金子霜急性毒性比较 [J]. 中国药物警戒, 2011, 8(1): 20-23.
- [5] Quigley E M. Gut bacteria in health and disease [J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2013, 9(9): 560-569.
- [6] Soyucen E, Gulcan A, Aktuglu-Zeybek A C, et al. Differences in the gut microbiota of healthy children and those with type 1 diabetes [J]. *Pediatr Int*, 2014, 56(3): 336-343.
- [7] 吴 云, 陈 瑞, 田维毅. 苦寒中药对肠道菌群结构影响的研究进展 [J]. 中国微生态学杂志, 2015, 27(2): 235-239.
- [8] Gumaer F, Casellas F, Borruel N, et al. Role of microecology in chronic inflammatory bowel diseases [J]. *Eur J Clin Nutr*, 2002, 56(4): S34-S38.
- [9] 朱娟娟, 张 超, 王英姿, 等. 千金子石油醚部位化学成分的研究 [J]. 山东中医药大学学报, 2014, 38(4): 381-382.
- [10] 王 瑶, 季宇彬, 陈明苍. 中药与肠道菌群相互作用的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2012, 9(2): 12-13.