

火麻仁油对 D-半乳糖致衰老小鼠肠道功能调节作用研究

李根林, 郭晨阳, 吴宿慧*, 李寒冰*, 孙静雅

河南中医药大学, 河南省仲景方药健康衰老产业工程研究中心, 河南 郑州 450046

摘要: 目的 探讨火麻仁油对 D-半乳糖致衰老小鼠肠道微生态的调节作用。方法 将 72 只昆明小鼠分对照组、模型组、阳性对照组(金双歧组)、火麻仁油(分别为 12.0、6.0、3.0 mL/kg)组, 雌雄各半。对照组每天颈背部 sc 生理盐水, 其他 5 组 sc 1% D-半乳糖水溶液造模, 给药体积为 10 mL/kg; 1 h 后对照组 ig 生理盐水, 其他各给药组 ig 不同剂量的药物, 给药体积为 20 mL/kg, 连续 ig 42 d, 给药结束后, 观察体质量变化; 留取回盲部近端肠管组织及盲肠、结肠内粪便。通过革兰氏染色分别检测革兰阳性杆菌(G⁺b)、阴性杆菌(G⁻b)、阳性球菌(G⁺c)、阴性球菌(G⁻c)菌群数量; 称取盲肠质量计算盲肠系数, 并通过 HE 染色观察回肠黏膜变化; 测定结肠粪便 pH 值; 气相色谱法检测粪便短链脂肪酸(SCFA)的含量。结果 火麻仁油可以上调杆菌的比值, 降低球菌的比值, 降低盲肠系数及结肠 pH 值; 显著改善模型动物的结肠病理变化, 使黏膜上皮完整, 腺体排列整齐, 杯状细胞丰富, 绒毛丰富; 能显著升高乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸的含量($P < 0.01$), 显著降低异戊酸的含量($P < 0.05$)。结论 所测高、中、低 3 个质量浓度的火麻仁油均可优化 D-半乳糖致衰老小鼠模型的肠道菌群结构, 改善肠道微生态环境, 可为火麻仁的临床应用及产品开发提供理论支持。

关键词: 火麻仁油; 衰老; 肠道微生态; 短链脂肪酸; 革兰氏染色; 乙酸; 丙酸; 丁酸; 异丁酸; 异戊酸

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)13-3509-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.13.019

Regulatory effects of *Cannabis Fructus* oil on gut microecology in D-galactose-induced aging mice

LI Gen-lin, GUO Chen-yang, WU Su-hui, LI Han-bing, SUN Jing-ya

Henan Zhongjing Medicine Health-Aging Engineering Research Center, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of *Cannabis Fructus* oil on the regulation of gut microecology in D-galactose-induced aging mice. **Methods** The Kunming mice were divided into control group, model group, positive control group (Jin Shuangqi group), *Cannabis Fructus* oil (12.0, 6.0, 3.0 mL/kg) group with six males and six females in each group. In the control group, normal saline was injected subcutaneously into the back of the neck every day. The other five groups were injected subcutaneously with 1% D-galactose aqueous solution, and the volume was 10 mL/kg. After 1 h, the control group was given normal saline by intragastric administration. The other groups were intragastrically administered with different doses of *Cannabis Fructus* oil for 42 d, and the dosage volume was 20 mL/kg. After the end of the administration, the change in body weight was analyzed; The proximal intestinal tissue of the ileocecal area and the feces in the cecum and colon were retained. Gram staining was used for the detection of Gram-positive bacilli (G⁺b), Gram-negative bacilli (G⁻b), Gram-positive cocci (G⁺c) and Gram-negative cocci (G⁻c); The ileal mucosa changes were observed by HE staining; The pH value of the colon feces was determined by pH meter; And the content of short-chain fatty acids (SCFA) in feces was determined by gas chromatography. **Results** The results showed that *Cannabis Fructus* oil increased the ratio of bacillus, reduced the ratio of cocci and the cecal coefficient, decreased the pH value of the colon, significantly improved the colon pathological changes of the model animals with unbroken membrane skin, regular glands and rich cup cells and fluff rich, increased the content of SCFAs in the intestine of mice, and significantly increased ($P < 0.01$) the content of acetic acid, propionic acid, butyric acid, isobutyric acid, and significantly reduced ($P < 0.01$) the content of isovaleric acid. **Conclusion** It could conclude that

收稿日期: 2019-12-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81473435); 2018 年度河南省科技攻关(182102310305)

作者简介: 李根林, 男, 硕士, 教授, 研究方向为中药学。Tel: (0371)65934070 E-mail: lgl88@hactcm.edu.cn

*通信作者 吴宿慧, 女, 博士, 副教授, 研究方向为中药药理学。Tel: (0371)65962746 E-mail: wusuhui@hactcm.edu.cn

李寒冰, 男, 博士, 教授, 研究方向为中药学。Tel: (0371)65962746 E-mail: lihanbing@hactcm.edu.cn

Cannabis Fructus oil can up-regulate the ratio of *D*-galactose-induced mice intestinal bacteria structure, improve the intestinal microecology, so as to provide theoretical support for clinical application and product development of *Cannabis Fructus* oil.

Key words: *Cannabis Fructus* oil; aging; intestinal microecology; short-chain fatty acids; Gram staining; acetic acid; propionic acid; butyric acid; isobutyric acid; isovaleric acid

老年医学问题是当今急需解决的一项社会问题。如今,医学界对衰老已由治疗型转为预防保健型而达到健康衰老^[1]。中国传统医学对延年益寿的研究有着悠久的历史,早在《皇帝内经》中就有抗衰老的精辟论述:“上古之人,其知道者,法于阴阳,和以术数,饮食有节,起居有常,不妄作劳,故能形与神俱,而尽终其天年,度百岁乃去。”《神农本草经》最早记载了抗衰老的药物,认为中医药在防治衰老及老年性疾病的研究上有着独特的优势。

近年来,随着微生物学和分子生物学的发展,有许多学者认为肠道菌群的失衡与衰老的发生发展有着密不可分的关系。Benno 等^[2]对 15 例健康长寿老年人(平均年龄 84 岁)的肠道菌群进行了研究,并用一组平均年龄为 68 岁的老年人作对照,结果发现长寿组肠道内含有大量的双歧杆菌,对照组肠道内则以乳杆菌和梭状芽胞杆菌为主。也有报道婴儿与老人的肠道菌群不一样,老年人肠道的双歧杆菌、乳酸杆菌明显少于婴幼儿^[3-4]。此提示优化菌群与延缓衰老有一定的关系。短链脂肪酸(SCFA),也称挥发性脂肪酸,主要包括乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、异戊酸等,作为肠道菌群的主要代谢产物^[5],对人体代谢和多个器官产生较大的影响。

火麻仁 *Cannabis Fructus* 为桑科大麻属植物大麻 *Cannabis sativa* L. 的干燥成熟种子,具有润肠通便、滋养补虚的功效,常用治疗老年虚性便秘和习惯性便秘。《神农本草经》云其“味甘、平。主补中益气,肥健不老。”是卫生部公布的药食两用的中药材之一。火麻仁含有丰富的油脂,火麻仁油中的不饱和脂肪酸约占 89%,主要有棕榈油酸、油酸、亚油酸、 α -亚麻酸、 γ -亚麻酸等;饱和脂肪酸以棕榈酸、硬脂酸、花生酸为主,以及丰富的维生素 E (VE) 和植物甾醇^[6]。前期研究结果表明,火麻仁及火麻仁油可以具有一定的抗氧化能力、能清除动物体内的自由基,具有一定的抗衰老能力^[7-10],且可改善复方地芬诺酯致便秘模型大鼠的肠道炎症及肠道菌群结构^[11-13],结合火麻仁润肠通便之功效,本研究从调整肠道菌群功能的角度探究火麻仁延缓衰老的作用机制,以期进一步提高和拓展火麻仁的临床应用价值。

1 材料

1.1 药材及试剂

火麻仁药材购自安徽亳州,经河南中医学院陈随清教授鉴定为桑科大麻属植物大麻 *Cannabis sativa* L. 的干燥成熟果实,系《中国药典》2015 年版一部收录的正品火麻仁药材。

D-半乳糖由 GENVIEW 公司生产,批号 2B13020120。对照品乙酸(质量分数 99%)、丙酸(质量分数 99.5%)、丁酸(质量分数 99.5%)、异丁酸(质量分数 99%)、异戊酸(质量分数 99%),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;双歧杆菌乳杆菌三联活菌片(金双歧),批号 20130605,内蒙古双奇药业股份有限公司;革兰氏染色液(批号 G1060)由 Solarbio 提供;焦性没食子酸,20120116,遵义林源医药化工有限责任公司生产;氢氧化钠,批号 20120703,天津市瑞金特化学品有限公司生产。

1.2 主要仪器

PSH-100 生化培养箱,中科生命科技股份有限公司;NikoN 90i 全自动显微图像分析系统,尼康仪器(上海)有限公司;PHS-3C 型精密 pH 计,上海苏特电气有限公司;LdZX-30KBS 立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂;KH2200DB 型数控超声波清洗器,昆山禾力超声仪器有限公司;MULTISKAN GO 全波段酶标仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;Agilent Technologies 7890A 气相色谱仪,安捷伦科技有限公司;Sigma1-14 型离心机,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。

1.3 实验动物

昆明种小鼠,许可证号:SYXK(豫)2017-0001,SPF 等级,由河南省实验动物中心提供。

2 方法

2.1 药物配制

2.1.1 混合对照品溶液配制 乙酸 5 μ L,丙酸 4 μ L,丁酸、异丁酸、异戊酸、正己酸各 1 μ L,使用超纯水定容至 20 mL, -20 $^{\circ}$ C 保存,备用。

2.1.2 10 mg/mL D-半乳糖溶液配制 取 5 g D-半乳糖溶于生理盐水定容于 500 mL,得 10 mg/mL D-半乳糖溶液。避光保存。

2.1.3 阳性对照药(金双歧) 取金双歧 10 片,

溶于生理盐水定容于 100 mL, 得浓度为 5×10^6 个/mL 活菌数的金双歧溶液。

2.1.4 火麻仁油溶液的制备 火麻仁药材净选去皮后 120 °C 炒制 15 min, 用压榨法榨油, 收率为 21.5% (火麻仁油以单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸为主, 质量分数高达 80% 以上), 所得油状物呈透明黄绿色, 密封于棕色玻璃瓶内, 避光、4 °C 保存备用。用时取一定量火麻仁油, 按照人-小鼠体表面积公式计算后得火麻仁油高、中、低剂量分别为 12.0、6.0、3.0 mL/kg。

2.2 动物分组及给药

将 72 只小鼠随机分为 6 组, 每组 12 只, 雌雄各半, 分开饲养。分别为对照组, 模型组, 金双歧组 (20 mL/kg), 火麻仁油高、中、低剂量 (12、6、3 mL/kg, 对应生药剂量分别为 55.8、27.9、13.95 g/kg) 组。对照组每天颈背部 sc 生理盐水 (给药体积为 10 mL/kg), 1 h 后 ig 给予空白对照剂生理盐水 (给药体积为 20 mL/kg)。其他 5 组动物按 10 mL/kg sc 1% D-半乳糖水溶液造模, 1 h 后各给药组小鼠 ig 给予不同剂量试验药物 (给药体积为 20 mL/kg), 连续 42 d。实验过程中, 每 3 天称体质量 1 次, 每日观察小鼠的皮毛色泽、饮食、饮水、大小便、精神活动情况等。

2.3 盲肠形态变化、菌群结构观察及结肠内菌群 pH 值的测定 (酸碱度 pH 计法)

给药结束后处死小鼠, 立即取少量回盲部近端肠管组织及盲肠粪便快速薄层涂片、固定、染色及镜检。每份标本计数 4 个显微油镜 (10×100 倍, 只计数 200 个细菌中各菌群数量, 取平均值) 视野下的革兰阳性杆菌 (G^+b) 革兰阴性杆菌 (G^-b)、革兰阳性球菌 (G^+c)、革兰阴性球菌 (G^-c) 数量, 计算各菌群比率及杆球菌比值, 了解肠道菌群结构。之后, 迅速解剖小鼠取出盲肠, 用 0.9% 生理盐水洗净表面血迹, 用吸水纸吸干水分后用电子天平称质量, 计算盲肠系数。

盲肠系数 = 盲肠质量/体质量

精密称取结肠内粪便 0.2 g, 加 10 倍的水, 混匀, 室温放置 10 min, 14 800 转/min 离心 10 min, 取上清液用于 pH 值的测定。

2.4 小鼠回肠黏膜变化情况的观察

取出回肠, 用 0.9% 生理盐水洗净表面血迹, 放入中性缓冲甲醛液固定, 待 HE 染色、镜检, 观察回肠黏膜变化。

2.5 SCFA (乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、异戊酸) 的检测^[14]

精密称取结肠内粪便 0.1 g, 加水定容至 1.5 mL, 混匀, 用 5 mol/L 盐酸调 pH 值至 2~3, 室温放置 10 min, 14 800 r/min 离心 35 min, 取上清液滤过后用于 GC 检测。检测器: 火焰离子化检测器 (FID); 色谱柱: 毛细管柱 RTs-wAX, 30 m×0.25 mm, 涂层膜厚 0.25 mm; 升温程序: 初始柱温 100 °C, 保持 1 min, 以 3 °C/min 的速度升至 130 °C, 保持 1 min, 再以 20 °C/min 的速度升至 200 °C, 在 200 °C 保持 10 min。FID 和进样口温度: 分别为 230、230 °C。载气: 氮气。气体体积流量: 氢气、空气和氮气分别以 30、300、20 mL/min 流动比率混合。进样: 自动进样, 进样量为 1 μL; 运行时间 25 min。

2.6 统计方法

用 SPSS 17.0 for windows 统计软件, 计量资料组间比较采用单因素方差分析、重复测量方差分析, 多重比较采用 LSD 方法, $P < 0.05$ 认为数据间有显著的统计学意义, $P < 0.01$ 认为数据间有极显著的统计学意义。

3 结果

3.1 火麻仁油对 D-半乳糖致衰老小鼠体质量的影响

重复测量结果显示, 实验过程中, 各组小鼠体质量组间无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

3.2 火麻仁油对 D-半乳糖致衰老小鼠肠道菌群结构的影响

结果表明, 火麻仁油高、中、低剂量组杆菌总数、球菌总数组间有显著性差异 ($P < 0.01$)。模型组与对照组相比, 杆菌总数显著降低, 球菌总数显著升高; 火麻仁高、中剂量组、金双歧组杆菌总数显著高于模型组 ($P < 0.01$), 低剂量组杆菌总数与模型组相比没有明显变化 ($P > 0.05$); 与模型组球菌总数相比, 火麻仁油高、中剂量组及金双歧组明显降低 ($P < 0.01$), 火麻仁油低剂量组降低不显著 ($P > 0.05$), 无统计学意义; 火麻仁油中剂量组杆球菌比值显著高于模型组 ($P < 0.01$), 对照组、金双歧组杆球菌比值高于模型组 ($P < 0.05$), 其他各组与模型组相比无统计学意义 ($P > 0.05$)。

模型组与对照组比较, G^+b 杆菌占总菌群数的比值显著降低; 火麻仁油高、中、低剂量组及金双歧组 G^+b 杆菌占总菌群数的比值显著高于模型组; 与对照组相比火麻仁油中剂量组、金双歧组 G^+b 杆

菌占总菌数的比值增高 ($P < 0.05$), 其他组与对照组相比 ($P > 0.05$) 无统计学意义; 火麻仁油高剂量组与中剂量组相比无统计学意义 ($P > 0.05$), 火麻仁油中剂量组明显高于低剂量组 ($P < 0.01$); 金双歧组与中剂量组相比无统计学意义 ($P > 0.05$)。

模型组与对照组比较, G^+c 球菌占总菌群数的比值显著升高; 火麻仁油高、中、低剂量组、金双歧组 G^+c 球菌占总菌群数的比值显著低于模型组 ($P < 0.01$); 与对照组相比, 火麻仁油中剂量组显著降低 ($P < 0.01$), 见表 2 和图 1。

表 1 火麻仁油对 *D*-半乳糖致衰老小鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Effect of *Cannabis Fructus* oil on body weight of *D*-galactose-induced aging mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	给药剂量/ (mL·kg ⁻¹)	体质量/g				
		第 1 天	第 13 天	第 28 天	第 34 天	第 42 天
对照	—	27.32 ± 2.99	35.30 ± 5.89	40.19 ± 6.23	41.85 ± 6.01	41.95 ± 6.43
模型	—	26.94 ± 1.94	33.39 ± 3.28	37.27 ± 2.63	39.09 ± 4.08	40.75 ± 3.50
金双歧	20.0	27.26 ± 1.76	35.37 ± 3.17	40.29 ± 3.98	42.22 ± 3.68	41.84 ± 4.34
火麻仁油	12.0	26.90 ± 3.15	33.63 ± 4.32	38.33 ± 4.92	39.00 ± 5.01	39.99 ± 7.48
	6.0	26.42 ± 1.71	34.28 ± 4.99	39.49 ± 5.73	41.59 ± 6.79	42.84 ± 5.66
	3.0	26.45 ± 2.25	32.48 ± 4.40	36.89 ± 4.40	38.36 ± 5.77	39.76 ± 5.40

表 2 火麻仁油对 *D*-半乳糖致衰老小鼠肠道内杆菌总数、球菌总数、杆菌球菌比值、 G^+b 杆菌、 G^+c 球菌的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)
Table 2 Effect of *Cannabis Fructus* oil on total intestinal bacillus, total cocci, ratio of bacillus to cocci, G^+ bacilli, G^+ cocci in *D*-galactose-induced aging mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	给药剂量/(mL·kg ⁻¹)	杆菌总数	球菌总数	杆菌球菌比值	G^+b 杆菌/%	G^+c 球菌/%
对照	—	188.25 ± 1.50	11.75 ± 1.50	16.23 ± 2.26	44.50 ± 2.43	2.63 ± 0.47
模型	—	173.75 ± 2.21 ^{##}	26.25 ± 2.21 ^{##}	6.65 ± 0.63 [#]	15.13 ± 3.90 ^{##}	7.00 ± 1.58 ^{##}
金双歧	20.0	190.50 ± 3.00 ^{**}	9.50 ± 3.00 ^{**}	21.67 ± 6.90 [*]	48.12 ± 2.49 ^{**}	2.50 ± 0.40 ^{**}
火麻仁油	12.0	183.50 ± 1.29 ^{**}	16.50 ± 1.29 ^{**}	11.17 ± 0.95	49.25 ± 0.86 ^{**}	2.13 ± 0.47 ^{**}
	6.0	192.25 ± 2.87 ^{**}	7.75 ± 2.87 ^{**}	28.64 ± 14.16 ^{**}	51.13 ± 0.85 ^{**}	1.25 ± 0.64 ^{**}
	3.0	176.75 ± 2.21	23.25 ± 2.21	7.66 ± 0.81	44.00 ± 0.70 ^{**}	2.25 ± 0.65 ^{**}

与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 表 3、4 同

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, the same with table 3 and 4

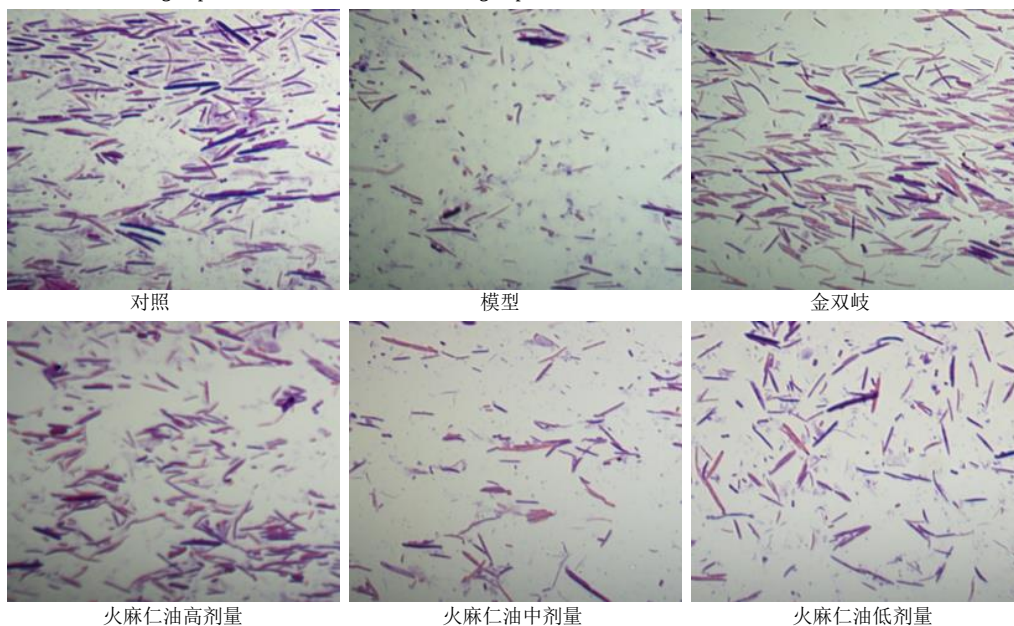


图 1 火麻仁油对 *D*-半乳糖致衰老小鼠肠道菌群结构的影响 (革兰氏染色, $\times 1\ 000$)

Fig. 1 Effect of *Cannabis Fructus* oil on intestinal bacteria of *D*-galactose-induced aging mice (Gram staining, $\times 1\ 000$)

3.3 火麻仁油对 *D*-半乳糖致衰老小鼠结肠粪便 pH 值、结肠系数的影响

结果 (表 3) 表明, 模型组与对照组相比, pH 值、盲肠系数明显升高 ($P<0.01$), 火麻仁油高、中剂量组及金双歧组与模型组相比, pH 值、盲肠系数明显降低 ($P<0.01$), 火麻仁油低剂量组与模型组相比, pH 值降低 ($P<0.05$)。

3.4 火麻仁油对 *D*-半乳糖致衰老小鼠回肠黏膜变化情况的观察

对照组回肠的黏膜上皮完整, 腺体排列比较整齐, 其中间分布着杯状细胞, 绒毛丰富, 突入到肠腔, 上皮未发现萎缩、增生、糜烂、坏死, 间质未见血管充血、水肿、出血等现象。模型组回肠黏膜上皮略有变薄, 杯状细胞减少, 绒毛减少, 黏膜细胞质浓缩、深染, 与对照组比较有差异。火麻仁

表 3 火麻仁油对 *D*-半乳糖致衰老小鼠粪便 pH 值、盲肠系数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 3 Effect of *Cannabis Fructus* oil on fecal pH and cecal coefficient of *D*-galactose-induced aging mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	给药剂量/ (mL·kg ⁻¹)	粪便 pH 值	盲肠系数
对照	—	6.50±0.22	1.10±0.22
模型	—	7.10±0.33 ^{##}	1.77±0.31 ^{##}
金双歧	20.0	5.87±0.08 ^{**}	1.17±0.10 ^{**}
火麻仁油	12.0	6.29±0.31 ^{**}	1.26±0.17 ^{**}
	6.0	6.70±0.14 ^{**}	1.40±0.24 ^{**}
	3.0	6.80±0.26 [*]	1.34±0.15 ^{**}

油高、中、低剂量组及金双歧组与模型组相比, 黏膜上皮完整, 腺体排列整齐, 杯状细胞丰富, 绒毛丰富。见图 2。

3.5 GC 法检测条件的的方法学考察

3.5.1 待测组分的确定 在本实验色谱条件下, 根据对照品的保留时间, 确定样品中的待测组分, 由实验结果可知, 样品中 SCFA 与对照品中 SCFA 的出峰时间、位置基本相吻合, 证明各峰位置是待测组分。对照品中乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、异戊酸的保留时间及 RSD 分别为 13.20 min、2.32%, 14.68 min、1.53%, 15.98 min、1.50%, 15.10 min、2.20%, 16.55 min、0.93%; 样品中乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、异戊酸的保留时间及 RSD 分别为 13.22 min、1.81%, 14.73 min、0.98%, 16.00 min、0.76%, 15.14 min、0.69%, 16.57 min、0.68%。对照品气相色谱图及样品脂肪酸检测图见图 3。

3.5.2 线性相关考察 SCFA 的检测使用外标法, 进样量为 1 μL。以 SCFA 各酸对照品峰面积为纵坐标 (Y), 浓度为横坐标 (X), 使用 Excel 回归分析, 求出标准曲线的回归方程分别为乙酸 $Y=18.366X+22.962$, $r^2=1.0000$, 线性范围 3.125~200.000 nmol/L; 丙酸 $Y=42.16X+26.068$, $r^2=1.0000$, 线性范围 1.5625~100.0000 nmol/L; 正丁酸 $Y=62.518X+49.532$, $r^2=1.0000$, 线性范围 1.5625~100.0000 nmol/L; 异丁酸 $Y=83.176X-0.8746$, $r^2=0.9996$, 线性范围 48.828~2000.000 pmol/L; 异戊酸 $Y=70X+103.8$, $r^2=0.9995$, 1.5625~

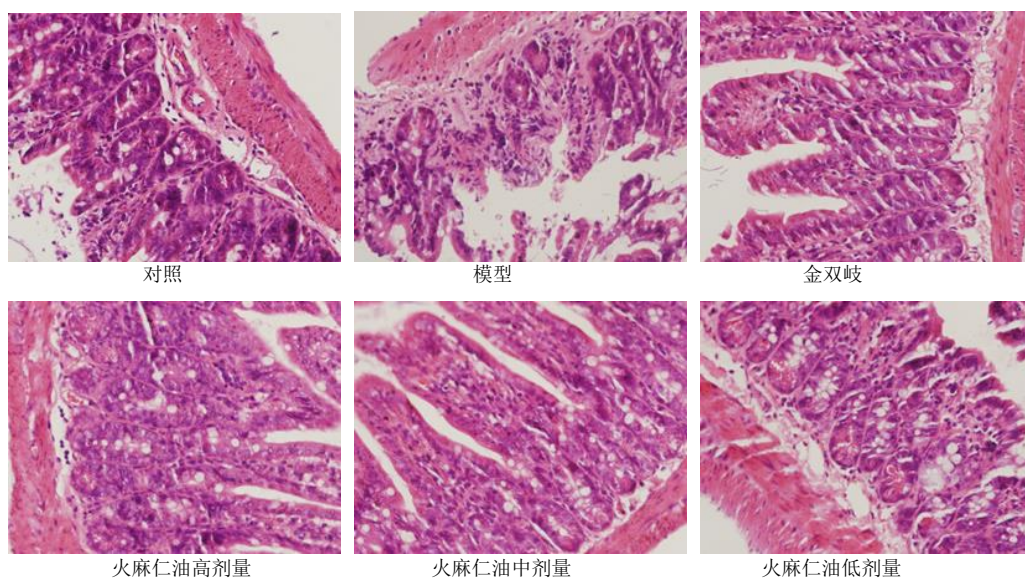


图 2 火麻仁油对 *D*-半乳糖致衰老小鼠回肠黏膜的影响 (HE 染色 10×40)

Fig. 2 Effect of *Cannabis Fructus* oil on ileal mucosa of *D*-galactose-induced aging mice (HE staining 10 × 40)

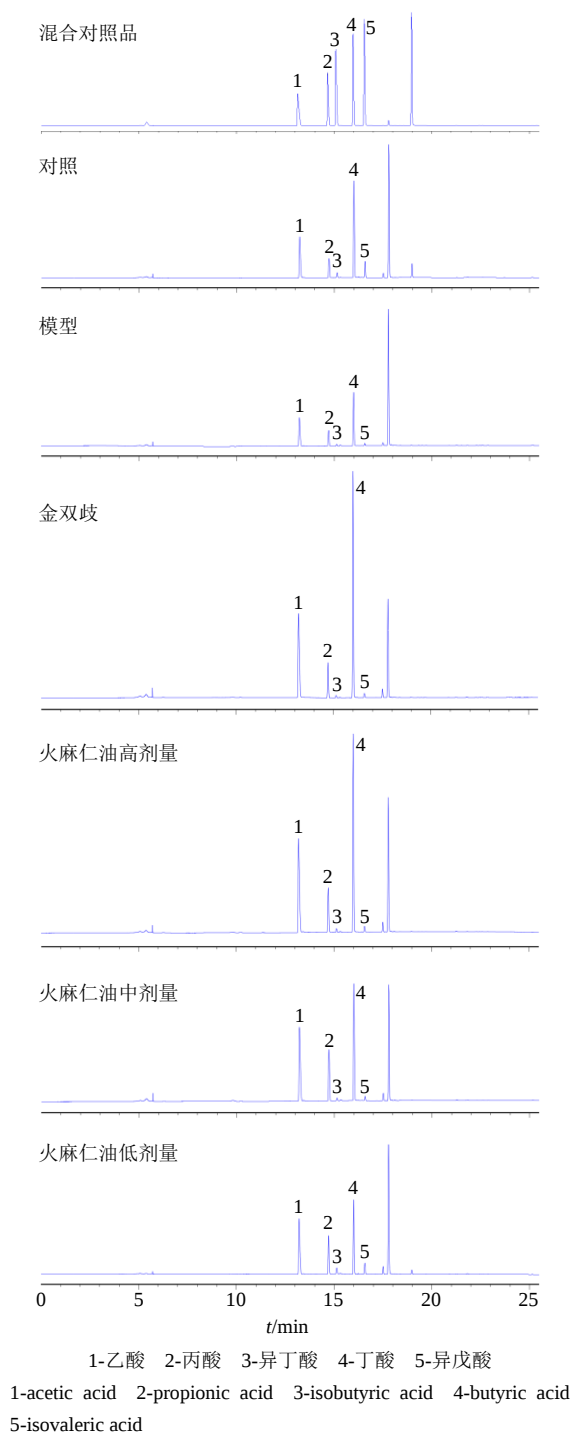


图 3 SCFA 混合对照品 (A) 和火麻仁油对 *D*-半乳糖致衰老小鼠盲肠内 SCFA (B) 的气相图

Fig. 3 Gas phase diagram of mixed SCFA (A) and effect of *Cannabis Fructus* oil on SCFA in cecum of aging mice induced by *D*-galactose (B)

100.000 0 nmol/L; 结果表明, 乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、异戊酸在各自浓度范围内线性良好。

3.5.3 精密度试验 日内精密度通过取同一混合对照品溶液及同一样品溶液各测 10 次确定, 日间精密

度通过连续 3 d 测相同溶液, 每日各测定 3 次, 其中对照品中乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、异戊酸的日内精密度及 RSD 分别为 12.406 nmol、1.31%, 12.373 nmol、1.67%, 6.178 nmol、1.50%, 0.231 nmol、1.89%, 0.267 nmol、2.78%; 日间精密度及 RSD 分别为 12.464 nmol、0.48%, 12.490 nmol、1.23%, 6.1526 nmol、1.76%, 0.208 nmol、2.71%, 0.253 nmol、1.28%, 样品中乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、异戊酸的日内精密度及 RSD 分别为 9.485 nmol、1.80%, 1.359 nmol、0.86%, 2.626 nmol、0.29%, 0.139 nmol、1.36%, 0.130 nmol、1.93%; 日间精密度及 RSD 分别为 9.147 nmol、3.43%, 1.329 nmol、2.77%, 2.557 nmol、2.30%, 0.135 nmol、1.67%, 0.127 nmol、2.03%。表明仪器精密度良好。

3.5.4 准确度试验 精密称取同一小鼠盲肠粪便 2 份各 0.2 g, 1 份做为本底, 另 1 份于提取前加入已知浓度的对照品溶液, 按检测样品 SCFA 的预处理方法处理样品然后进样检测。对照品分高、中、低 3 个浓度, 每个浓度 3 份。测得乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、异戊酸的提取回收率分别为 99.77%、101.34%、102.16%、100.06%、101.22%, 表明该方法准确可靠。

3.5.5 稳定性试验 取同一样品, 在相同色谱条件下分别测 0、2、4、6、8 h 时 SCFA 各酸的含量, 每次测 5 次, 并计算乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、异戊酸的 RSD 值分别为 2.33%、2.20%、2.73%、1.79%、0.134%, 表明在该时间范围之内进行测定不影响实验结果。

3.6 火麻仁油对 *D*-半乳糖致衰老小鼠盲肠中 SCFA (乙酸、丙酸、正丁酸、异丁酸、异戊酸) 的含量影响

与对照组相比, 模型组乙酸、丙酸、异戊酸显著降低 ($P < 0.05$), 丁酸、异丁酸含量极显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 金双歧组、火麻仁油高、中、低剂量组的乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸均显著增多 ($P < 0.05$), 火麻仁油高剂量组的异戊酸却显著降低 ($P < 0.05$)。见表 4。

4 讨论

生物体肠道菌群是一个复杂的微生态系统。营养物质在动物机体自身消化系统和菌群的作用下可分解产生一些化学成分, 其中有益成分如有机酸, 有害成分如氨、生物胺、硫化氢、吲哚和酚类等。有益成分在消化道可形成生物屏障和化学屏障阻止

表 4 火麻仁油对 D-半乳糖致衰老小鼠盲肠内 SCFA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 4 Effect of *Cannabis Fructus* oil on SCFA in cecal of D-galactose-induced aging mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	给药剂量/ (mL·kg ⁻¹)	C/(nmol·μL ⁻¹)				
		乙酸	丙酸	异丁酸	丁酸	异戊酸
对照	—	10.90±2.47	1.35±0.18	0.24±0.11	5.25±1.56	0.69±0.04
模型	—	7.91±1.02 [#]	0.85±0.36 [#]	0.12±0.04 ^{##}	1.62±0.35 ^{##}	0.22±0.03 [#]
金双歧	20.0	24.65±4.48 ^{**}	2.28±1.15 ^{**}	0.15±0.04 [*]	11.72±1.80 ^{**}	0.16±0.03
火麻仁油	12.0	20.21±2.42 ^{**}	3.18±0.39 ^{**}	0.15±0.13 [*]	7.83±2.27 ^{**}	0.12±0.02 [*]
	6.0	17.93±4.52 ^{**}	2.63±0.51 ^{**}	0.14±0.03 [*]	6.06±2.64 ^{**}	0.19±0.02
	3.0	16.40±3.60 ^{**}	1.79±0.48	0.22±0.05 ^{**}	5.59±1.55 ^{**}	0.28±0.03

致病菌的定植和繁殖。另外像乳酸菌和链球菌其代谢产生的乳酸、丙酸等有机酸，可使消化道内 pH 值降低，能抑制包括很多革兰阳性菌在内的病原菌等不耐酸性菌的存活与繁殖，而使肠道内有益菌重新占据优势地位，建立起良好的微生物群系。此外，有机酸可加强肠道的蠕动和分泌，促进饲料消化，提高营养物质的吸收^[15-16]。

肠道细菌几乎都能分解糖类，产生短链脂肪酸。但是结肠是 SCFA 主要产生的部位（有人也发现右结肠和盲肠中 SCFA 的含量较高，虽然左右结肠 SCFA 的含量不同，但是乙酸、丙酸、丁酸的比率相同^[17]），因为结肠细菌首先在此部位同小肠来的碳水化合物接触，发酵活性最强^[5,18]。另外由于细菌连续的代谢活动，结肠内的氧化还原电位很低，只有极微量的氧存在，是一个适合严格厌氧微生物繁衍的环境。复杂的碳水化合物经过连续水解成为简单的糖，受到菌群的进一步代谢，最终成为多种发酵产物，如 SCFA，其他有机酸、乙醇、氢和二氧化碳等。SCFA 的种类和数量受到发酵基质的数量、类型、降解速率、降解程度，以及肠道菌群和宿主生理状态等因素的影响，所以不同细菌产生不同的短链脂肪酸。如乳杆菌属主要产生乳酸，双歧杆菌属主要产生乙酸、乳酸、甲酸；拟杆菌属主要产生乙酸、丁酸、琥珀酸等。

SCFA 是益生菌产生的活性物质有机酸之一，其对宿主有着重要的生理功能，如调节肠道菌群，维持体液和电解质的平衡，给宿主提供能量、给肠道上皮细胞提供营养等。吸收后的乙酸是细菌给宿主提供能量的主要来源。丙酸经血液吸收后主要参与肝脏内的代谢，参与丙酮酸逆转化葡萄糖的过程，同时可能抑制脂肪的合成，它的影响主要体现在对碳水化合物和胆固醇的代谢方面^[19]。丁酸主要被上

皮细胞利用，是上皮细胞的（1）主要能量来源；（2）细胞膜脂类合成的基质；（3）促进消化道细胞生长；（4）诱导细胞分化；（5）影响基因表达；（6）与细胞骨架构建改变有关；（7）增加组蛋白乙酰化；（8）诱导细胞编程死亡等。另外丁酸能明显抑制肿瘤细胞的生长，延长倍增时间^[20]。

据文献报道^[5]，测定生物基质中 SCFA 的水平可以整体诊断体内厌氧菌的变化，SCFA 的含量可以反映细菌的活性。由于不同细菌产生不同的短链脂肪酸，人体肠道产生短链脂肪酸的能力不同，因此肠道内短链脂肪酸含量的变化可以反映出人体肠道菌群结构与活性的差异。瑞典的 Bottcher 等^[20]通过检测 25 例过敏性疾病及 47 例健康 13 月龄婴儿大便中菌群相关代谢产物，发现过敏性疾病婴儿粪便中丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸和戊酸水平降低，而乙酸和与难辨梭状芽胞杆菌相关的异己酸明显增高，提示过敏性疾病患儿与正常婴儿肠道菌群及其代谢存在差异，而检测的胆固醇/粪醇的比值和 FTA 在过敏与非过敏的婴儿中无差异。李婉等^[21]用低聚木糖连续 14 d 喂小鼠，结果低聚木糖能够促进小鼠肠道代谢产生乙酸、丙酸、丁酸，提高肠道短链脂肪酸总量。有人研究发现魔芋精粉在二甲腈诱发大鼠结肠癌中对肠道菌群、中性类固醇、短链脂肪酸均有影响^[22]。王洪存等^[23]用气相色谱法测人尿中短链脂肪酸，结果发现正常尿液中仅能测出乙酸和微量丙酸，若尿液中有异戊酸、丙酸等短链脂肪酸可能为病理性尿液。王烨^[24]采集维吾尔族正常与糖尿病人群粪便样本各 15 例，哈萨克族正常与糖尿病人群粪便样本各 15 例，提取粪便样品中肠道菌群代谢产物 SCFA，结果维吾尔族、哈萨克族糖尿病人群与正常血糖人群相比，肠道菌群代谢产物 SCFA 均有差异，糖尿病人群的肠道菌群代谢产物 SCFA 较正

常人群在肠道的含量明显减少,说明糖尿病人群肠道菌群中的益生菌数量减少;而维吾尔族与哈萨克族的正常人群相比,肠道菌群代谢产物 SCFA 无统计学差异性,维吾尔族与哈萨克族的糖尿病人群相比,肠道菌群代谢产物 SCFA 也无统计学差异性。杨晓庆等^[25]采用高脂饮料喂养加腹腔注射链脲佐菌素(STZ)的方法建立糖尿病小鼠模型,连续给药5周后,收集动物粪便,测粪便中短链脂肪酸及D-乳酸。糖尿病小鼠粪便中的肠道菌群代谢产物与血糖之间存在着密切的关系,代谢产物的差异性,提示肠道菌群的差异性,反映出糖尿病小鼠存在肠道菌群紊乱。前期研究中,发现火麻仁油可有效改善肠道菌群结构,使动物新鲜粪便中有益菌如双歧杆菌、乳酸杆菌等数量增加,盲肠中细菌总数增加^[11],而拟杆菌属、双歧杆菌属、真杆菌属等是常见的产 SCFAs 的细菌,参与机体代谢,提供能量,提高营养吸收,增加延缓衰老的可能性。本实验中,衰老模型小鼠中 SCFAs 的含量降低,给予火麻仁油后,乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸含量均显著增加,非常有可能与火麻仁油改善衰老小鼠模型的肠道菌群结构有一定关系,即可间接表明火麻仁油可以通过调节肠道菌群而延缓衰老,对于此,本课题组将继续研究。

另外,有研究表明,肠道菌群影响着肠道免疫的形成和功能^[26],可以调节肠道上皮杯状细胞分泌黏蛋白,参与各种免疫过程。而且肠黏膜层能使细菌固定和抑制过度的免疫产生共生。回肠黏膜病变,可能是因为肠道菌群失调导致。正常哺乳动物的肠道中存在着大量的细菌,细菌可以分解宿主不能分解的物质,或者是脱落的肠道上皮细胞以及一些肠道分泌物等,一旦菌群失调,细菌不能很好的利用这些残留物质,导致残留物质的堆积,盲肠变大^[27]。实验结果表明,模型组盲肠系数明显升高,表明肠道菌群失调;给药后,火麻仁油各剂量组以及金双歧组盲肠系数降低,可能与肠道菌群结构有所调整有关。

综上所述,火麻仁油增加了肠道内 SCFA 的含量,为益生菌的生长创造了良好的条件,不利于有害菌的生长,使肠道内杆菌比例上调,球菌比例下降,盲肠系数降低,结肠 pH 值降低,粪便总固形物降低,提示益生菌增多,火麻仁油可以优化肠道菌群结构,发挥健康衰老作用,可能与其补益与泻下作用有内在关联。

参考文献

- [1] Kaeberlein M, Rabinovitch P S, Martin G M. Healthy aging: The ultimate preventative medicine [J]. *Science*, 2015, 350(6265): 1191-1193.
- [2] Benno Y, Endo K, Mizutani T, *et al.* Comparison of fecal microflora of elderly persons in rural and Urban areas of Japan [J]. *Appl Environ Microb*, 1989, 55(5): 100-105.
- [3] Goncharova G I, Dorofeichuk V G, Smolianskaia A Z, *et al.* Microbial ecology of the intestine in health and in pathology [J]. *Antibiot Khimioter*, 1989, 34(6): 461-462.
- [4] Biagi E, Franceschi C, Rampelli S, *et al.* Gut microbiota and extreme longevity [J]. *Curr Biol*, 2016, 26(11): 1480-1485.
- [5] 陈燕, 曹郁生, 刘晓华. 短链脂肪酸与肠道菌群 [J]. *江西科学*, 2006, 24(28): 38-40.
- [6] 陈则华, 陈彤, 李伟, 等. 火麻仁油提取、化学成分及功能研究进展 [J]. *食品与机械*, 2018, 34(6): 192-196.
- [7] 吴宿慧, 李寒冰, 吕宁, 等. 火麻仁与人源肠道菌相互作用的初步研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(5): 1189-1197.
- [8] 吴宿慧, 郭媛媛, 张神涛, 等. 火麻仁油在家蚕抗衰老实验中的性别差异的研究 [J]. *中药药理与临床*, 2015, 31(1): 100-103.
- [9] 李根林, 曹亚蕊, 吴宿慧, 等. 火麻仁油对衰老模型小鼠血脂水平及炎症、抗氧化相关指标的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2015, 31(1): 109-111.
- [10] 李寒冰, 马永洁, 苗静静, 等. 火麻仁油对衰老模型小鼠皮肤相关指标的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(9): 201-205.
- [11] 李寒冰, 吴宿慧, 李根林, 等. 火麻仁油对便秘大鼠肠道微生态的改善作用 [J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(8): 1878-1881.
- [12] 李寒冰, 吴宿慧, 李根林, 等. 火麻仁油对便秘大鼠肠道炎症反应的改善作用 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(8): 3599-3602.
- [13] 李寒冰, 吴宿慧, 张颜语, 等. 基于肠道内环境调整的火麻仁润下作用的现代研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(14): 3334-3342.
- [14] 杨晓庆, 李琳琳, 王烨. 小鼠肠道菌群代谢产物与糖尿病的相关性研究 [J]. *中国微生态杂志*, 2012, 23(2): 134-135.
- [15] 田碧文, 胡宏. 阿胶、五味子、刺五加、枸杞对双歧杆菌生长的影响 [J]. *中国微生态杂志*, 1996, 8(2): 11-13.
- [16] 刘彩虹, 张和平. 肠道菌群与肠道内营养物质代谢的相互作用 [J]. *中国乳品工业*, 2014, 42(5): 33-36.

- [17] 李寒冰, 吴宿慧, 张颜语, 等. 中药与肠道菌相互作用研究进展 [J]. 中成药, 2016, 38(1): 147-151.
- [18] 刘松珍, 张 雁, 张名位, 等. 肠道短链脂肪酸产生机制及生理功能的研究进展 [J]. 广东农业科学, 2013, 40(11): 99-103.
- [19] 李 菊, 张日俊. 动物肠道菌群结构与代谢化学成分的相互关系 [J]. 中国微生态学杂志, 2008, 20(2): 189-190.
- [20] Bottcher M F, Nordin E K, Sandin A, *et al.* Microflora-associated characteristics in faeces from allergic and nonallergic infants [J]. *Clin Exp Allergy*, 2000, 30(11): 1590-1596.
- [21] 李 婉, 张晓峰, 常爱武, 等. 低聚木糖对小鼠肠道菌群和短链脂肪酸的影响 [J]. 河南工业大学学报: 自然科学版, 2014, 35(5): 93-96.
- [22] 侯蕴华, 张立实, 张茂玉, 等. 魔芋精粉在二甲腈诱发大鼠结肠癌中对肠道菌群、中性类固醇、短链脂肪酸的影响 [J]. 现代预防医学, 1995, 22(1): 43-45.
- [23] 王洪存, 孙树英, 王秀玉. 短链脂肪酸 (SCFA) 与代谢异常的关系 [J]. 泰山医学院学报, 1988, 4(9): 362-367.
- [24] 王 焱. 肠道菌群代谢产物与糖尿病的相关性研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2008.
- [25] 杨晓庆, 李琳琳, 王 焱. 小鼠肠道菌群代谢产物与糖尿病的相关性研究 [J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(2): 134-140.
- [26] 李文霞, 曾本华, 袁 静, 等. GF 昆明小鼠主要重量系数及血液生理指标的测定 [J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(9): 780-783.
- [27] 陈小林, 任宏宇. 肠道微生物群组与肠道免疫的关系 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2014, 23(11): 1245-1248.