

• 药理与临床 •

肉桂精油对大鼠肠道梭菌属 IV 簇菌群和拟杆菌群的影响

彭喜春, 张志超, 黄丽珠, 詹宏林, 王 聪, 张 宁, 刘 柳
暨南大学 食品科学与工程系, 广东 广州 510632

摘要: 目的 研究肉桂精油对正常大鼠肠道梭菌属 IV 簇菌群和拟杆菌属两类主要菌群的影响。方法 SD 大鼠每天给予肉桂精油 0.384 3 g/kg, 连续给药 30 d, 取结肠和直肠内容物, 针对肠道菌群的 16S rRNA, 采用末端限制性片段多态性技术 (TRFLP) 分析肠道梭菌属 IV 簇细菌和拟杆菌属细菌的数量、多样性及其分布。结果 肉桂精油给药后, 肠道梭菌 IV 簇细菌和拟杆菌的数量、多样性及分布均发生显著变化, 尤其是肠道梭菌 IV 簇细菌的变化更大。肉桂精油对结肠和直肠中两类菌的影响存在差异。结论 肉桂精油对肠道梭菌 IV 簇和拟杆菌属两类主要菌群的影响可能是肉桂对肥胖和糖尿病的作用机制之一。

关键词: 肉桂精油; 肠道菌群; 梭菌; 拟杆菌; 末端限制性片段多态性分析技术

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)04-0437-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.04.013

Effects of essential oil from *Cinnamomum Cassia* on *Clostridia* flora IV and *Bacteroides* in gut of rats

PENG Xi-chun, ZHANG Zhi-chao, HUANG Li-zhu, ZHAN Hong-lin, WANG Cong, ZHANG Ning, LIU Liu
Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: Objective To investigate the impact of essential oil (cinnamon oil) from *Cinnamomum cassia* (EOCC) on *Clostridia* flora IV and *Bacteroides* in gut of normal rats. **Methods** SD rats were administered with EOCC (0.384 3 g/kg) for 30 d and the colon and rectal contents were sampled. The population, diversity, and distribution of *Clostridium* flora IV and *Bacteroides* in the samples were analyzed by the terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) method based on the intestinal flora 16S ribosomal RNA gene. **Results** Both the intestinal flora population, diversity, and distribution of *Clostridia* flora IV and *Bacteroides* changed significantly due to the injection, especially for *Clostridia* flora IV. Additionally, EOCC exerted the different effects on colon and rectal microflora. **Conclusion** The effects of EOCC on *Clostridia* flora IV and *Bacteroides* in gut might be the functional mechanism of cinnamon oil in curing obesity and diabetes.

Key words: essential oil from *Cinnamomum Cassia*; intestinal flora; *Clostridium*; *Bacteroides*; terminal restriction fragment length polymorphism

肠道菌群的平衡对宿主的营养及健康状况极为重要, 一旦失衡易引起机体代谢及免疫系统紊乱^[1-2]。肠道菌群受饮食、抗生素、外源性物质等多种因素影响, 其中饮食是影响肠道菌群多样性的主要因素, 如一些食物中的功能性成分可影响肠道菌群的生长及代谢活动, 改变它们的分布及功能^[3-5]。

肉桂为樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl

的干燥树皮, 是广泛使用的药食两用植物。肉桂对多种由肠道菌群失调引起的慢性疾病, 如肥胖和糖尿病等具有疗效^[6-8], 体外研究显示肉桂精油对多种细菌具有一定的抑制效果^[9-12]。在肠道菌群中, 梭菌属 IV 簇和拟杆菌属细菌是两类与机体过度摄入能量而导致肥胖有密切关系的细菌^[13-14]。因此本实验以肉桂精油喂饲 SD 大鼠, 采用末端限制性片

收稿日期: 2012-03-26

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项基金资助项目 (21611414)

作者简介: 彭喜春 (1976—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为营养与肠道微生物。

段多态性分析技术 (terminal restriction fragment length polymorphism, TRFLP), 研究肉桂精油对大鼠肠道梭菌 IV 簇细菌和拟杆菌属细菌的影响, 进一步探讨肉桂对肥胖及糖尿病等慢性疾病的作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

样品购于广州天河区石牌东貳天堂药店, 由暨南大学食品科学与工程系张广文副教授鉴定为樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥树皮。FAM 标记的特异性引物 (表 1), 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成; Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 Hha I、dNTP, 日本 Takara 生物公司; 细菌基因组提取试剂盒, 四川天泽基因工程有限公司。

表 1 针对 16S rRNA 的 PCR-TRFLP 引物
Table 1 PCR-TRFLP primers for 16S rRNA

目标微生物	引物	引物序列 (5'-3')
拟杆菌	32f	(FAM)ACGCTAGCTACAGGCTT ^[15]
	708r	CAATCGGAGTTCTTCGTG ^[15]
梭菌属 IV 簇细菌	sg-Clep-F	(FAM)CACAAGCAGTGAGT ^[16]
	sg-Clep-R	CTTCCTCCGTTTGTCAA ^[16]

1.2 仪器

RE—52 型旋转蒸发器, 上海嘉鹏科技有限公司; SHZ—D (III) 型循环水式真空泵, 巩义市予华仪器有限责任公司; XW—80A 型旋涡混合器, 江苏省海门市其林贝尔仪器制造有限公司; PL602—S 电子天平, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; 核酸和蛋白质测定仪, 德国 Eppendorf 公司; TC—25/H 型 PCR 基因扩增仪, 杭州博日科技有限公司; Sub-Cell GT BASIC 型电泳仪, 意大利 Bio-Rad 公司; AmpGene Gel 3000 型凝胶成像系统, 北京鼎永科技有限公司; GT—163 型高速离心机, 北京时代永利离心机有限公司; THZ—98A 型恒温振荡培养箱, 上海一恒科技有限公司; YXQ—SG46—280S 型不锈钢手提式压力蒸汽灭菌器, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂。

1.3 动物

SD 大鼠, 体质量 (200±20) g, 购于南方医科大学实验动物中心, 许可证号: SCXK (粤) 2011-0015。

2 方法

2.1 肉桂精油的制备

将肉桂粉碎后过 10 目筛, 50 g 肉桂粉加入 200

mL 蒸馏水, 于旋转蒸发器中 100 °C 蒸馏 3 h, 收集馏分, 得率为 2.13%, 主要成分为肉桂醛、醋酸苯丙烯酯、安息香醛或苯甲醛、芳樟醇、胡椒酚^[12]。4 °C 备用。

2.2 分组、给药及标本采集

SD 大鼠分成 2 组, 每组 6 只, 雌雄各半, 其中 1 组为对照组, 喂饲正常饲料和饮用水, 另 1 组在正常进食饮水外加喂 0.384 3 g/kg 的肉桂精油 (相当于每天摄入 15.34 g/kg 的肉桂)。30 d 后, 每组随机取 3 只大鼠解剖, 分别取全结肠 (包括升结肠、横结肠、降结肠和乙状结肠 4 部分) 和直肠的内容物, -20 °C 备用。

2.3 肠道菌群基因组 DNA 的提取与检测

按照粪便中细菌基因组提取试剂盒说明书提取不同样品中的细菌基因组 DNA, 用凝胶电泳和紫外分光光度计检测基因组 DNA 的质量浓度、纯度及量。用去离子水将 DNA 调整为 40 ng/μL, 分别取 2 μL 加于 PCR 反应混合物中进行 PCR。

2.4 PCR 和酶切分析

PCR 反应混合物如下: 模板 DNA 20 ng, Taq DNA 聚合酶 0.025 U/μL, 1×反应缓冲液 (含 Mg²⁺)、引物各 0.25 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L, 反应总体积 50 μL。PCR 反应程序如下: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 45 s, 梭菌 55 °C、拟杆菌 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环, 72 °C 延伸 3 min。PCR 产物纯化根据 NewProbe PCR 产物纯化试剂盒说明书进行。用 Hha I 酶切, 反应体系如下: PCR 产物 75 ng, 限制性内切酶 Hha I 1U, 10×酶切缓冲液 4 μL (含 20 μg/mL BSA 0.4 μL), 用去离子双蒸水补充至总体积 40 μL, 置于 37 °C 酶切 4 h, 加热至 65 °C 维持 20 min 钝化酶。酶切产物送至 Invitrogen 公司检测末端限制性片段 (terminal restriction fragments, TRF)。

2.5 TRFLP 图谱分析

分析时, 剔除小于 50 bp 和大于 600 bp 的 TRF。以单个 TRF 的峰面积除以总 TRF 峰面积, 获得相对峰面积, 忽略相对丰度小于 0.5% 的 TRF 片段。通过平行样相互比较获得可重复的片段, 相邻的限制性片段小于 1 bp 时视为相同的片段^[17-18]。

核糖核酸丰度指数 (ribotype richness, S); 用 Mills 等^[18-19]的方法计算 Shannon 多样性指数 (Shannon diversity index, H) 和均一度指数 (evenness, E)。用 Jaccard 相似度指数评价两个样

本微生物群落的相似度,以 Khafipour 等^[20]的方法计算;相似度分析(similarity percentage, SIMPER)用于鉴定样品间对差异有贡献的片段^[21-22]。

3 结果

3.1 对大鼠肠道梭菌属和拟杆菌群数量的影响

肉桂精油处理后,大鼠结肠和直肠中的梭菌属 IV 簇细菌均有不同程度的减少,其中在结肠中减少非常显著,在直肠中减少显著;拟杆菌数量在结肠中增加,

但在直肠中减少,但变化并不显著。结果见表 2。

3.2 肠道菌群多样性分析

对梭菌属 IV 簇和拟杆菌属的多样性(S 和 H 值)计算显示,肉桂精油处理后,结肠中梭菌属 IV 簇细菌减少极显著($P<0.01$),直肠中的也有减少但不显著;而拟杆菌属细菌在结肠中增加非常显著($P<0.01$),在直肠中有增加但不显著。对 E 值的影响有同样的趋势。结果见表 3。

表 2 肉桂精油对大鼠肠道中梭菌属 IV 簇和拟杆菌属菌群的影响

Table 2 Effects of EOCC on *Clostridia* flora IV and *Bacteroides* in gut of rats

组 别	梭菌属 IV 簇相对峰面积		拟杆菌属相对峰面积	
	结肠	直肠	结肠	直肠
对照	62 650±8 774	51 614±1 386	21 795±8 195	28 725±5 994
肉桂精油	36 121±2 313**	31 575±1 661*	24 072±1 391	25 465±1 206

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$, 下同

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group, same as below

表 3 不同样品中梭菌属 IV 簇细菌和拟杆菌属细菌的 TRFLP 谱 (Hha I 酶切) 中的多样性和均一性指数

Table 3 Diversity and evenness indices for TRFLP profiles (Hha I digest) of *Clostridia* flora IV and *Bacteroides* from different samples

组 别		梭菌属 IV 簇			拟杆菌属		
		S	H	E	S	H	E
对照	结肠	6±0	2.132	0.825	6±1	1.747	0.676
	直肠	5±1	2.013	0.867	4±0	1.506	0.753
肉桂精油	结肠	4±1	1.045**	0.450**	6±0	2.209**	0.855**
	直肠	5±0	1.883	0.811	6±1	2.156**	0.834

3.3 对肠道菌群结构的影响

肉桂精油处理前后,大鼠结肠和直肠体现出不同的菌群结构。结肠中梭菌 IV 簇的片段只有 57 bp 和 89 bp 在精油处理后丰度增加,其中 89 bp 的增加非常显著($P<0.01$),其余片段则有所减少,其中 177 bp 减少非常显著($P<0.01$),其余片段变化不显著;而直肠中的梭菌 IV 簇的片段 175 bp 和 177 bp 减少且非常显著($P<0.01$),66 bp 增加非常显著($P<0.01$),其余片段丰度增加,但不显著。结果见图 1。

拟杆菌属的 TRFLP 谱(Hha I 酶切)中,结肠和直肠实验样的 72、76、89 bp 在处理均有所增加,而 70、74、614 bp 均有所减少。其中,74 bp 和 614 bp 在结肠中减少非常显著($P<0.01$),而 76、89 bp 在结肠和直肠中均增加极显著($P<0.01$)。结果见图 2。

3.4 菌群相似度分析

样品 TRFLP 谱的 SIMPER 分析结果显示,处

理前后对结肠中梭菌属 IV 簇细菌分布变化起主要贡献的是 89 bp 片段的细菌,而直肠中各片段的贡献值比较均一;对拟杆菌属细菌在结肠中的分布变化起主要作用的是 614 bp 和 76 bp 代表的细菌,在直肠中则是 74 bp 和 89 bp 代表的细菌。结果见表 4。

拟杆菌属细菌对照样和实验样间的 Jaccard 相似度指数值较低(均只有 35%左右),表明精油处理后,结肠和直肠中的梭菌 IV 簇和拟杆菌属的群落组成发生了很大变化。结果见表 5。

4 讨论

近年来,饮食对肠道菌群的影响受到了很大关注。目前研究肠道菌群的组成及变化的方法有两种,一种是 TRFLP 技术,另一种是变性梯度凝胶电泳技术(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)^[23-26],两种方法各有优缺点。本实验采用 TRFLP 技术研究肉桂精油对大鼠结肠和直肠菌群的影响。植物化学物质被机体摄入后,有些组分能

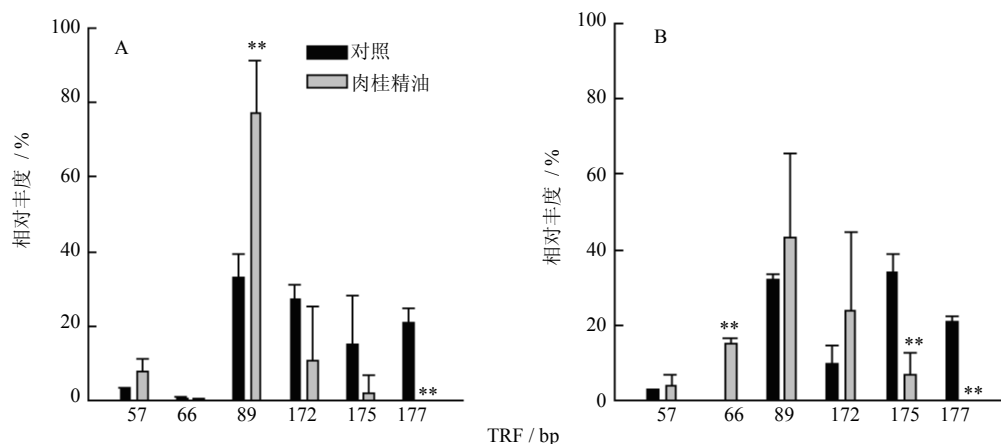


图 1 大鼠结肠 (A) 和直肠 (B) 中梭菌 IV 簇的 TRF (Hha I 酶切) 及其相对丰度

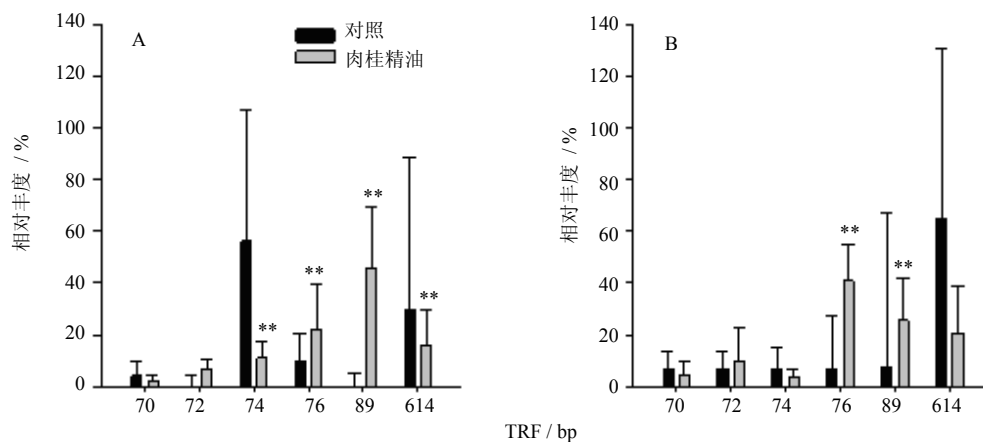
Fig. 1 TRF (Hha I digest) and relative abundance of *Clostridium* flora IV in colon (A) and rectum (B) of rats

图 2 大鼠结肠 (A) 和直肠 (B) 中拟杆菌属的 TRF (Hha I 酶切) 及其相对丰度

Fig. 2 TRF (Hha I digest) and relative abundance of *Bacteroidetes* in colon (A) and rectum (B) of rats

表 4 大鼠结肠和直肠样品细菌 TRFLP 谱的 SIMPER 分析

Table 4 SIMPER analysis of TRFLP profiles of bacterial samples in colon and rectum of rats

细菌	片段 / bp	FC ^a / %	
		结肠	直肠
梭菌 IV 簇	66	— ^b	17
	89	44	12
	172	16	16
	175	13	30
	177	21	24
	177	21	24
拟杆菌属	72	—	5
	74	—	36
	76	34	10
	89	18	36
	614	44	10

a: 对照组与肉桂精油组样品中各差异片段数占总差异片段数的百分数 (仅列出 >5% 的数据); b: 示样品间的 FC < 5%

a: percentage of different fragments in total fragments from control and EOC groups (only > 5% listed); b: FC < 5% between samples

表 5 肉桂精油处理后结肠和直肠样品 TRFLP 谱中细菌群落组成的相似度

Table 5 Similarities of bacterial communities in TRFLP profiles of colon and rectal samples after EOCC treatment

细菌	肠道菌群的相似度 ^a / %	
	结肠	直肠
梭菌属 IV 簇	32.89	36.88
拟杆菌属	32.56	23.79

a: 基于 Jaccard 指数的相似度

a: similarity based on Jaccard index

在肝脏中被代谢转化, 转化产物以葡萄糖醛酸苷的形式分泌到胆汁中并在肠道中蓄积, 从而对肠道菌群的组成产生影响^[27]。本研究证实了这一推测, 发现肉桂精油对结肠和直肠中的梭菌属 IV 簇细菌和拟杆菌属细菌同时产生影响, 且这种影响存在差异, 即肉桂精油对梭菌属 IV 簇细菌在结肠中的分布、

组成的影响非常显著 ($P < 0.01$), 但对拟杆菌的影响则不显著, 这种差异值得更为深入研究。

人肠道菌群主要由厚壁菌门和拟杆菌门的细菌构成。其中 95% 的厚壁菌门细菌都是梭菌^[28], 而拟杆菌门只有拟杆菌属细菌。大量研究表明, 肥胖患者肠道的拟杆菌与厚壁菌之比减少^[10]。本研究表明, 肉桂精油使拟杆菌在结肠中的数量增加 (TRF 增加), IV 簇梭菌的数量减少, 并在使总菌群 (梭菌属 IV 簇细菌和拟杆菌) 数量下降的同时, 使梭菌属 IV 簇细菌的多样性也减少, 且改变了梭菌的组成, 而拟杆菌的多样性未发生显著变化, 但其组成却有显著变化, 这可能是肉桂具有减肥效果的机制之一。

参考文献

- [1] Nadal I, Donat E, Ribes-Koninckx C, *et al.* Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with celiac disease [J]. *J Med Microbiol*, 2007, 56(12): 1669-1674.
- [2] Santacruz A, Marcos A, Wärnberg J, *et al.* Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents [J]. *Obesity*, 2009, 17(10): 1906-1915.
- [3] Ley R E, Lozupone C A, Hamady M, *et al.* Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6(10): 776-788.
- [4] Campbell J H, Fahey Jr G C, Wolf B W. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats [J]. *J Nutr*, 1997, 127(1): 130-136.
- [5] Ping H, Zhang G, Ren G. Antidiabetic effects of cinnamon oil in diabetic KK-Ay mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(8/9): 2344-2349.
- [6] Laparra J M, Sanz Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals [J]. *Pharmacol Res*, 2010, 61(3): 219-225.
- [7] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, *et al.* Biological effects of essential oils — A review [J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(2): 446-475.
- [8] González-Castejón M, Rodríguez-Casado A. Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: A review [J]. *Pharmacol Res*, 2011, 64(5): 438-455.
- [9] Unlu M, Ergene E, Unlu G V, *et al.* Composition, antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae) [J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(11): 3274-3280.
- [10] Zu Y, Yu H, Liang L, *et al.* Activities of ten essential oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells [J]. *Molecules*, 2010, 15(5): 3200-3210.
- [11] 刘晓丽, 钟少枢, 吴克刚, 等. 丁香和肉桂精油气相抑菌活性研究 [J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(1): 21-25.
- [12] 严汉彬, 林岚岚, 丁力行, 等. 肉桂提取物抗菌及抗氧化的研究 [J]. 中国调味品, 2010, 35(7): 41-44.
- [13] Pryde S E, Duncan S H, Hold G L, *et al.* The microbiology of butyrate formation in the human colon [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, 217(2): 133-139.
- [14] Li M, Wang B, Zhang M, *et al.* Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes [J]. *PNAS*, 2008, 105(6): 2117-2122.
- [15] Bernhard A E, Field K G. A PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(10): 4571-4574.
- [16] Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, *et al.* Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(12): 7220-7228.
- [17] Dunbar J M, Ticknor L O, Kuske C R. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(1): 190-197.
- [18] Mills D K, Fitzgerald K, Litchfield C D, *et al.* A comparison of DNA profiling techniques for monitoring nutrient impact on microbial community composition during bioremediation of petroleum-contaminated soils [J]. *J Microbiol Methods*, 2003, 54(1): 57-74.
- [19] Falk M W, Song K G, Matiassek M G, *et al.* Microbial community dynamics in replicate membrane bioreactors—natural reproducible fluctuations [J]. *Water Res*, 2009, 43(3): 842-852.
- [20] Khafipour E, Li S, Plaizier J C, *et al.* Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(22): 7115-7124.
- [21] Clarke K R, Warwick R M. *Change in Marine Communities: An Approach to Statistical Analysis and Interpretation* [M]. 2nd Ed. Plymouth: Plymouth Marine Laboratory, 2001.
- [22] Rees G N, Baldwin D S, Watson G O, *et al.* Ordination and significance testing of microbial community composition derived from terminal restriction fragment length polymorphisms: Application of multivariate statistics [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2004, 86(4): 339-347.

- [23] Engelbrektson A, Korzenik J R, Pittler A, *et al.* Probiotics to minimize the disruption of faecal microbiota in healthy subjects undergoing antibiotic therapy [J]. *J Med Microbiol*, 2009, 58(5): 663-670.
- [24] Skřivanová E, Worgan H J, Pinloche E, *et al.* Changes in the bacterial population of the caecum and stomach of the rabbit in response to addition of dietary caprylic acid [J]. *Vet Microbiol*, 2010, 144(3/4): 334-339.
- [25] Grønvold A M, Mao Y, L'Abe'e-Lund T M, *et al.* Fecal microbiota of calves in the clinical setting: Effect of penicillin treatment [J]. *Vet Microbiol*, 2011, 153(3/4): 354-360.
- [26] Li F, Hullar M A J, Schwarz Y, *et al.* Human gut bacterial communities are altered by addition of cruciferous vegetables to a controlled fruit-and vegetable-free diet [J]. *J Nutr*, 2009, 139(9): 1685-1691.
- [27] Bazzocco S, Mattila I, Guyot S, *et al.* Factors affecting the conversion of apple polyphenols to phenolic acids and fruit matrix to short chain fatty acids by human faecal microbiota *in vitro* [J]. *Eur J Nutr*, 2008, 47(8): 442-452.
- [28] Eckburg P B, Bik E M, Bernstein C N, *et al.* Diversity of the human intestinal microbial flora [J]. *Science*, 2005, 308(4): 1635-1638.