

基于 16S rRNA 测序技术研究染料木素和大豆苷元对大鼠肠道菌群的影响

高葱葱^{1,2}, 葛 稳^{1,2}, 方怡超², 刘筱婧², 陈卫东¹, 周婷婷^{1,2*}

1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012

2. 中国人民解放军海军军医大学 药理学系, 上海 200433

摘要:目的 探讨不同给药时间内不同比例的染料木素和大豆苷元对大鼠肠道菌群的影响, 并筛选最佳给药条件。方法 SD 大鼠随机分为对照组、染料木素-大豆苷元(1:1)组、染料木素-大豆苷元(2:1)组和染料木素-大豆苷元(3:1)组, 给予药物干预 28 d, 收集粪便, 采用 16S rRNA 高通量测序对对照组和不同比例染料木素-大豆苷元给药 7、14、21、28 d 后的大鼠肠道菌群结构进行分析测定。结果 对给药组与对照组之间的 α 多样性、 β 多样性及门或属水平上物种组成进行差异分析, 发现染料木素和大豆苷元可以改变大鼠肠道菌群结构和组成, 显著提高肠道中乳杆菌的丰度。结论 染料木素-大豆苷元(1:1)给药 21 d 能够调控大鼠肠道菌群中乳杆菌的丰度。

关键词: 染料木素; 大豆苷元; 肠道菌群; 16S rRNA; 乳杆菌

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)03-0834-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.03.017

Effect of genistein and daidzein on gut microbiota in rats based on 16S rRNA sequencing

GAO Cong-cong^{1,2}, GE Wen^{1,2}, FANG Yi-chao², LIU Xiao-jing², CHEN Wei-dong¹, ZHOU Ting-ting^{1,2}

1. School of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012, China

2. Department of Pharmacy, People's Liberation Army Navy Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract: Objective To explore the effects of genistein and daidzein in different proportions at different administration time on gut microbiota of rats, and to screen the best administration conditions. **Methods** SD rats were randomly divided into control group, genistein-daidzein (1:1) group, genistein-daidzein (2:1) group and genistein-daidzein (3:1) group. After 28 d of drug intervention, feces were collected. 16S rRNA high-throughput sequencing was used to analyze the structure of gut microbiota in control group and the rats treated with different proportions of genistein and daidzein for 7, 14, 21, 28 d. **Results** The differences of α diversity, β diversity and species composition at phylum or genus level between the treatment group and control group were analyzed. It was found that genistein and daidzein could change the structure and composition of gut microbiota in rats, and significantly increased the abundance of *Lactobacillus* in intestinal tract. **Conclusion** Genistein-daidzein (1:1) administration for 21 d could regulate the abundance of *Lactobacillus* in gut microbiota of rats.

Key words: genistein; daidzein; gut microbiota; 16S rRNA; *Lactobacillus*

淡豆豉源于《本草拾遗》, 为豆科植物大豆 *Glycine max* (L.) Merr. 的干燥成熟种子(黑豆)的发酵加工品, 染料木素和大豆苷元是淡豆豉异黄酮中具有药理作用的主要活性成分, 均具有抗肿瘤、抗氧化、抑菌、调血脂、雌激素样和抗雌激素等作用^[1-2]。本课题组前期研究发现, 淡豆豉异黄酮能与肠道菌

群相互作用, 直接或间接地改变机体肠道菌群结构, 使肠道中乳杆菌等多种有益菌群的丰度增加^[3-4]。肠道菌群作为寄居在机体肠道内的微生物群落, 是机体后天形成的一个重要的“器官”, 不仅参与机体的生理病理过程^[5], 也参与药物在体内的代谢过程^[6-7]。乳杆菌是一种广泛用于人和动物疾病预防和治疗中

收稿日期: 2022-09-18

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81973457)

作者简介: 高葱葱(1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学。E-mail: congcongcoo@163.com

*通信作者: 周婷婷(1980—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药药效物质基础与体内代谢研究。

E-mail: tingting_zoo@163.com

的重要益生菌, 它不仅可以调节体内 β -葡萄糖苷酶的丰度^[8-9], 还能调节 II 相代谢酶的丰度^[10-11]; 前者有利于糖苷代谢为苷元, 后者有利于苷元进一步代谢为 II 相代谢物排出体外。本研究从组分配伍的角度出发, 利用淡豆豉异黄酮中具有药理作用的主要活性成分染料木素和大豆苷元不同比例来调节大鼠肠道菌群, 尝试找到能比拟淡豆豉调节大鼠肠道菌群中乳杆菌丰度的最佳条件, 为后续进一步研究淡豆豉异黄酮成分奠定基础。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 24 只, 6~8 周龄, 体质量 (160 ± 20) g, 由杭州医学院提供, 实验动物生产许可证号 SCXK (浙) 2019-0002。动物于海军军医大学动物实验中心适应性饲养 7 d, 每天接受 12 h 光照, 室温 (24 ± 2) °C, 相对湿度 (50 ± 10) %。动物实验经海军军医大学生物医学研究伦理委员会批准。

1.2 药品与试剂

染料木素 (质量分数为 98%, 批号 AF21021508)、大豆苷元 (质量分数为 98%, 批号 AF21021507) 购自成都埃法生物科技有限公司; 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 购自生工生物股份有限公司; 75%乙醇购自上海泰坦科技股份有限公司。

1.3 仪器

FA224 型电子天平 (上海舜宇恒平科学仪器有限公司); HITECH 纯水仪 (上海泰和仪器有限公司); KQ-800DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); -80 °C 超低温冰箱 (Panasonic 公司)。

2 方法

2.1 动物实验

参考前期课题组淡豆豉异黄酮提取率和异黄酮中染料木素和大豆苷元所占比例, 固定大豆苷元比例为 1, 给药剂量折合生药材 0.2 g/kg。SD 大鼠随机分为对照组、染料木素-大豆苷元 (1:1) 组、染料木素-大豆苷元 (2:1) 组和染料木素-大豆苷元 (3:1) 组, 每组 6 只。染料木素-大豆苷元 (1:1) 组 ig 1.6 mg/mL 染料木素 (8 mg/kg) 和 1.6 mg/mL 大豆苷元 (8 mg/kg), 染料木素-大豆苷元 (2:1) 组 ig 3.2 mg/mL 染料木素 (16 mg/kg) 和 1.6 mg/mL 大豆苷元 (8 mg/kg), 染料木素-大豆苷元 (3:1) 组 ig 4.8 mg/mL 染料木素 (24 mg/kg) 和 1.6 mg/mL 大豆苷元 (8 mg/kg), 对照组 ig 等体积 0.5% CMC-Na 溶液, 1 次/d, 连续 28 d。

2.2 样本收集

每 7 天收取一次大鼠粪便, 用棉签蘸取 75%乙醇于肛周消毒, 并通过腹部按摩法促使大鼠排便, 用灭菌镊子无菌采集每组粪便于灭菌冻存管中, 并置于 -80 °C 保存, 以待后续进行 16S rRNA 测序。

由于样本量较大, 故将各给药组每次收集的大鼠粪便混合集中作为一个样本, 排除样本间差异。除对照组外, 各给药组每个时间点收集的样本为一组, 分析不同给药时间的大鼠菌群变化。

2.3 生物信息学分析

对基于 Illumina NovaSeq PE250 测序平台得到的原始数据 (Raw Data) 进行拼接、滤过, 得到有效数据。然后再对有效数据进行可操作分类单元 (operational taxonomic units, OTUs) 聚类 and 物种分类分析。利用 Uparse 算法 (Uparse v7.0.1001) 对所有样本的有效数据, 以 97% 的一致性进行 OTUs 聚类并对 OTUs 的序列进行物种注释。使用 MUSCLE 软件 (Version 3.8.31) 进行快速多序列比对, 得到代表序列的系统发生关系的所有 OTUs。最后再对各样本的数据进行均一化处理, 以样本中数据量最少的为标准进行均一化处理, 后续的各种分析都是基于均一化处理后的数据。根据 OTUs 聚类结果, 对 OTUs 进行多样性指数分析, 包括单样本的多样性分析 (α 多样性分析) 和基于 unifracc 算法的各组样本之间的多样性分析 (β 多样性分析); 根据分类学信息, 在各分类水平上完成群落结构的统计分析。

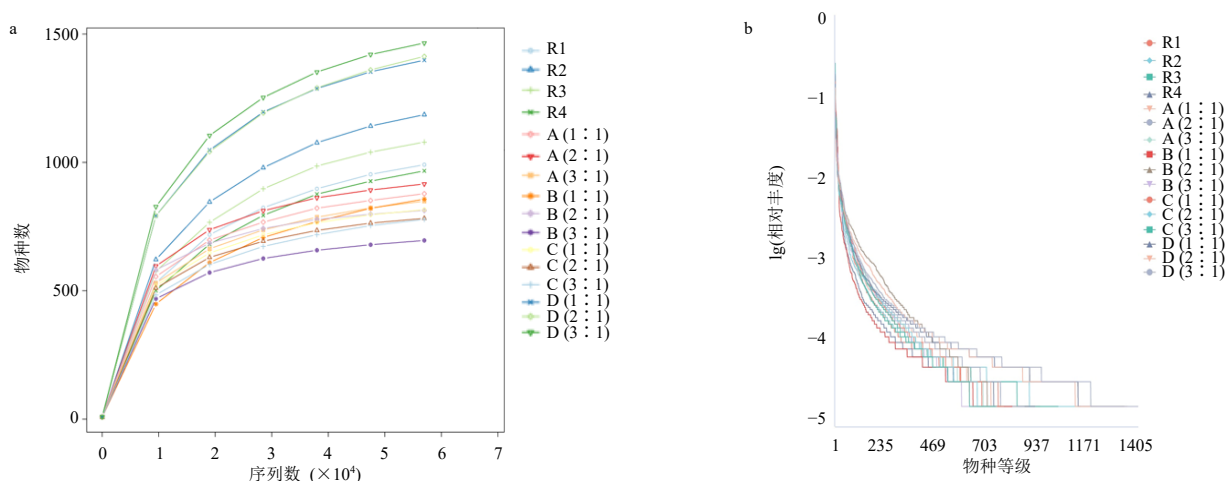
2.4 统计学分析

使用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析, 采用单因素方差分析用于多组数据组间比较, 两组之间比较采用 t 检验。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 稀释曲线和等级聚类曲线

稀释曲线反映的是测序数据量的合理性和样本中物种的丰富程度。它以从样本中随机抽取的测序数据量与其对应的物种数来构建曲线, 当曲线趋向平坦时, 说明测序数据量渐进合理, 各样本的稀释曲线见图 1-a, 可见样本的测序深度满足分析要求。等级聚类曲线能反映样本中物种的丰富度和均匀度, 各样本的等级聚类曲线见图 1-b, 在水平方向上, 物种的丰富度由曲线的宽度来反映, 宽度越大, 物种的丰富度越高; 在垂直方向上, 物种的均匀程度由曲线的平滑程度来反映, 物种分布越均匀, 曲线越平缓^[12]。



R-对照组 A-给药 7 d 样本 B-给药 14 d 样本 C-给药 21 d 样本 D-给药 28 d 样本, 下同

R-control group A-sample of 7 d after administration B-sample of 14 d after administration C-sample of 21 d after administration D-sample of 28 d after administration, same as below figures

图 1 各样本稀释曲线图 (a) 和等级聚类曲线图 (b)

Fig. 1 Rarefaction curve (a) and rank abundance (b) of each sample

3.2 α 多样性指数分析

大鼠肠道微生物菌群的丰富度和多样性主要通过 α 多样性指数来反映, 其中 Shannon 及 Simpson 指数用于评价群落分布多样性, Shannon 指数越大, 群落多样性越高, 物种分布越均匀; Simpson 指数与之相反。Chao1 及 Ace 指数用于评价群落分布丰度, 数值越大说明群落中含有的 OTUs 数目越多, 群落的丰度越大。如表 1 所示, 与对照组比较, 给药 7、14、21、28 d 样本的 Simpson 指数显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 给药 28 d 样本的 Shannon 指数显著升高 ($P < 0.01$), 表明大鼠粪便菌群多样性显著增加; 给药 7、14、21 d 样本的 Chao1 指数和 Ace 指数均显著降低 ($P < 0.01$), 表明群落丰度显著减小, 给药 28 d 样本的 Chao1 指数和 Ace 指数均显著升高 ($P < 0.01$), 表明群落丰度显著增大。表明给予染料木素和大豆苷元干预后, 大鼠肠道菌群分布多样性发生了不同程度的改变。

3.3 β 多样性分析

β 多样性能反映不同组间的群落多样性, 主要用于样本组间差异的比较。与 unweighted unifracc 算法相比, weighted unifracc 算法在计算群落样品之间的距离时候会考虑到样品中 OTUs 的丰度信息, 而前者不考虑相对丰度信息, 因此利用 weighted unifracc 算法来分析样本群落的多样性。 β 多样性指数组间差异检验中, 给药 7、21 d 样本的菌群多样性相对于对照组有显著性变化 ($P < 0.05$), 但给药 14、28 d 样本的菌群多样性没有显著性变化。主坐标分析 (principal coordinates analysis, PCoA) 评估了 5 组样本菌群结构和组成中的 β 多样性, 该分析的前 2 个主成分分别解释了总变量的 51.9% 和 20.83% (图 2)。 β 多样性指数组间差异检验和 PCoA 结果表明, 不同处理组中样本在群落结构和组成上和对照组之间的存在差异。

表 1 各组肠道菌群多样性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Diversity of gut microbiota in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	Shannon 指数	Simpson 指数	Chao1 指数	Ace 指数
R	5.89 ± 0.14	0.94 ± 0.01	1 046.48 ± 47.90	1 056.20 ± 48.83
A	6.39 ± 0.05	0.96 ± 0.01*	886.04 ± 13.86**	881.21 ± 13.88**
B	6.27 ± 0.56	0.96 ± 0.01*	783.24 ± 43.70**	782.42 ± 45.53**
C	6.17 ± 0.09	0.96 ± 0.01*	784.43 ± 15.06**	788.75 ± 13.17**
D	7.12 ± 0.15**	0.97 ± 0.01**	1 418.00 ± 26.75**	1 416.39 ± 26.81**

R-对照组 A-给药 7 d 样本 B-给药 14 d 样本 C-给药 21 d 样本 D-给药 28 d 样本 与 R 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

R-control group A-sample of 7 d after administration B-sample of 14 d after administration C-sample of 21 d after administration D-sample of 28 d after administration * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs R group

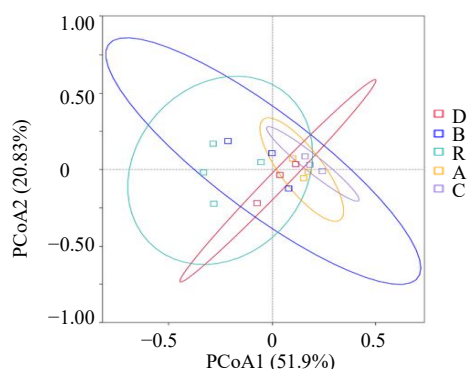


图 2 基于 weighted unifrac 算法的 PCoA 图

Fig. 2 PCoA graph based on weighted unifrac algorithm

3.4 物种组成分析与差异性分析

如图 3 所示, 门水平上, 大鼠粪便菌群主要由拟杆菌门 (Bacteroidota) 和厚壁菌门 (Firmicutes) 组成, 两者约占全部菌群的 90%, 其中对照组中拟杆菌门占比约为 65.5%, 厚壁菌门相对丰度为 25.1%; 给药 7 d 样本的拟杆菌门相对丰度为 38.2%, 厚壁菌门占比约为 50.7%; 给药 14 d 样本的拟杆菌门相对丰度为 53.2%, 厚壁菌门相对丰度为 40.6%; 给药 21 d 样本的拟杆菌门相对丰度为

35.7%, 厚壁菌门相对丰度为 55.7%; 给药 28 d 样本的拟杆菌门相对丰度为 44.3%, 厚壁菌门相对丰度为 41.5%。此外, 还有 unidentified_Bacteria、疣微菌门 (Verrucomicrobiota)、变形菌门 (Proteobacteria) 和放线菌门 (Actinobacteria) 等主要菌门组成。

如图 4 所示, 与对照组比较, 给药 7、14、21、

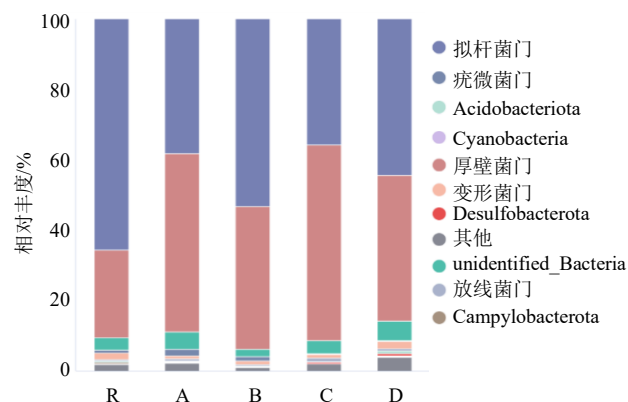


图 3 大鼠肠道菌群在门水平上的相对丰度

Fig. 3 Relative abundance of gut microbiota at phylum level of rats

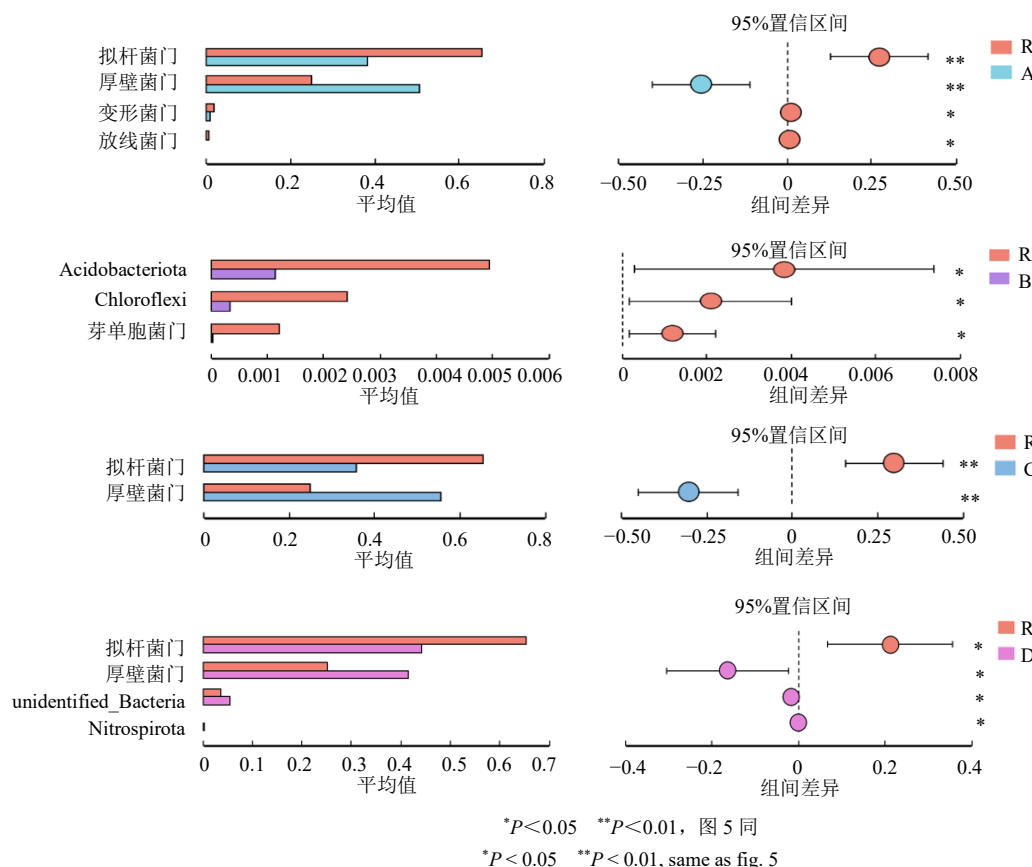


图 4 染料木素-大豆苷元干预的大鼠肠道菌群相对丰度在门水平上的差异

Fig. 4 Difference of relative abundance of gut microbiota in rats at phylum level induced by genistein-daidzein

28 d 样本的菌群结构发生了明显的变化, 给药 7 d 样本的厚壁菌门相对丰度较对照组有显著升高, 而拟杆菌门、变形菌门和放线菌门相对丰度显著降低; 给药 14 d 样本的放线菌门、Chloroflexi 和芽单胞菌门 (Gemmatimonadota) 的相对丰度均显著降低; 给药 21 d 样本的拟杆菌门相对丰度显著降低, 而厚壁菌门相对丰度显著增加; 给药 28 d 样本的拟杆菌门相对丰度显著降低, 厚壁菌门、unidentified_Bacteria 以及 Nitrospirota 相对丰度显著增加。可见, 染料木素和大豆苷元暴露能使大鼠粪便菌群结构发生明显改变, 多表现为拟杆菌门相对丰度的降低和厚壁菌门相对丰度的增加。

给药 14 d 样本在属水平上与对照组没有明显差异。如图 5 所示, 属水平上, 相较于对照组, 给药

7 d 样本的 MND1 相对丰度显著降低, 而颤螺菌属 *Oscillibacter*、[*Eubacterium*]*_xylanophilum_group*、GCA-900066575 和 Lachnospiraceae_UCG-001 相对丰度显著增加; 给药 21 d 样本的 MND1 相对丰度也显著降低, 而乳酸杆菌 *Lactobacillus* 和 [*Eubacterium*]*_xylanophilum_group* 的相对丰度显著增加; 给药 28 d 样本的 *Colidextribacter*、*Blautia*、[*Eubacterium*]*_xylanophilum_group*、*Clostridium_sensu_stricto_1* 等菌属的相对丰度均显著增加。表明染料木素和大豆苷元暴露使肠道菌群物种组成发生了显著性改变。此外, 在根据总体丰度前 35 的属在各样品中丰度水平制作的热图 (图 6) 中得到了类似的结果, 且热图中可以看到染料木素-大豆苷元 (1:1) 给药 21 d 样本中乳酸杆菌属丰度最高。

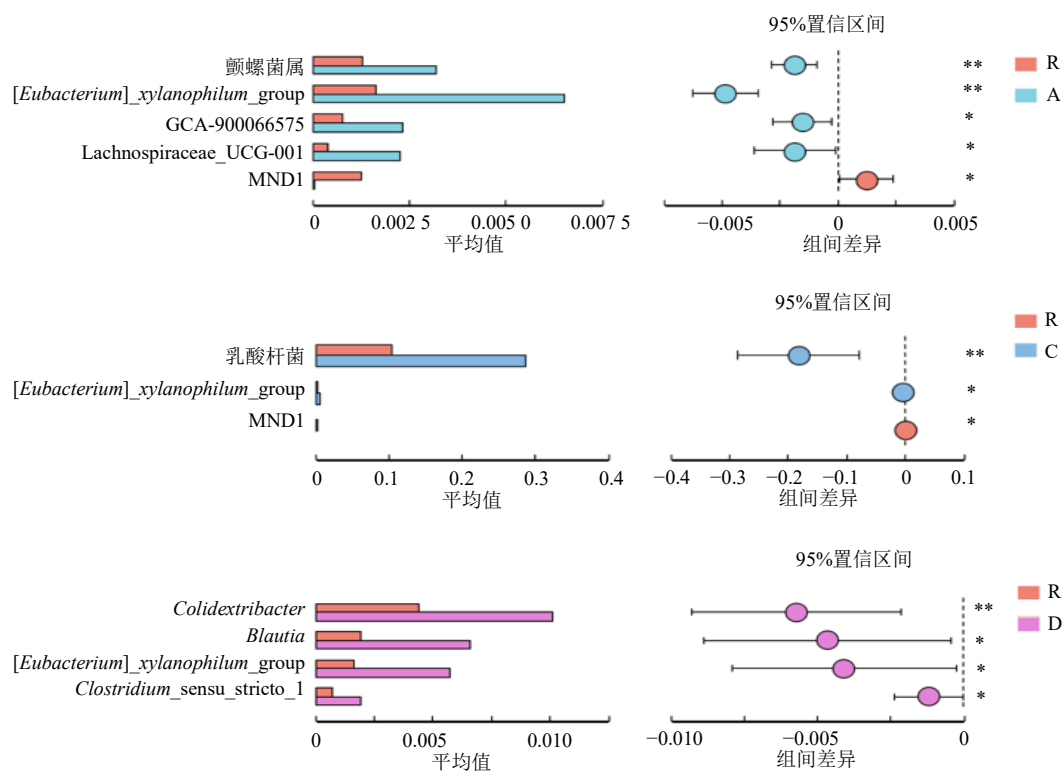


图 5 染料木素-大豆苷元干预的大鼠肠道菌群相对丰度在属水平上的差异

Fig. 5 Difference of relative abundance of gut microbiota in rats at genus level induced by genistein-daidzein

4 讨论

淡豆豉中染料木素和大豆苷元的比例是固定的, 本研究从组分配伍的角度出发, 采用了 3 种给药比例, 在此基础上探讨了给药时间对肠道菌群微生态的影响。微生物在体内定植需要一定的时间, 据此对给药 7、14、21、28 d 后的大鼠粪便菌群进行 16S rRNA 测序并分析各组 α 多样性、 β 多样性

及门或属水平上的物种组成差异。

α 多样性分析显示, 与对照组比较, 各给药组的 Shannon 及 Simpson 指数并非都有显著变化, 提示肠道菌群的多样性是处于动态平衡的, 并不会随着给药时间的变化而发生较大改变。而 Chao1 及 Ace 指数较于对照组均有显著性变化, 提示染料木素和大豆苷元可以使微生物群落丰度增加。

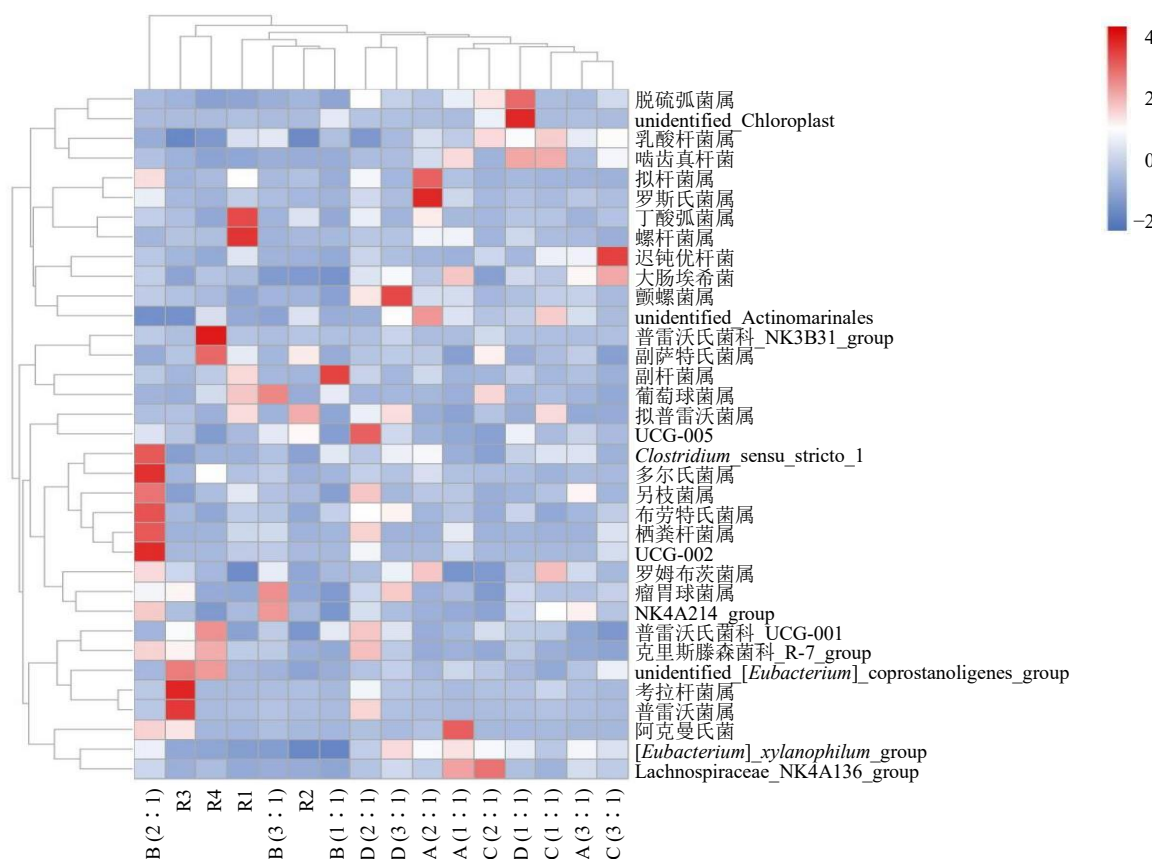


图 6 总体丰度前 35 位的属在各样本中相对丰度

Fig. 6 Relative abundance in each sample of top 35 genera in total abundance

在物种组成分析与差异性分析中,发现给药组中肠道菌群丰度均发生不同程度的改变,其中以拟杆菌门与厚壁菌门的丰度变化为主,给药 7、21、28 d 后的大鼠粪便菌群中厚壁菌门均显著增加,同时,各组中拟杆菌门均显著减少;但在给药 14 d 时,大鼠粪便菌群中拟杆菌门与厚壁菌门却并无显著性变化,这表明在 28 d 给药周期内肠道菌群并没有随着给药时间的延长而呈现趋势变化,猜测可能在给药前期,新生菌群与机体自身的肠道菌群之间存在一定的“竞争”,这种“竞争”可能包括宿主营养供给、生存空间和各菌群生长速度等^[13],继续给药后,维持了新生菌群的生长条件,从而使新生菌群能够在肠道内定植,成为优势菌群。在属水平上,乳杆菌也没有随着给药时间的延长而持续增长,而是在给药 21 d 时,乳杆菌丰度相较于对照组有显著增加。热图中也可以看到各菌群没有随着给药时间无限增长或减少,而是在宿主自身环境的作用下处于动态平衡。

本研究还发现,在属水平上,与对照组比较,给药 7、21、28 d 样本的[Eubacterium]_xylanophilum_group

的相对丰度均显著增加。[Eubacterium]_xylanophilum_group 属于厚壁菌门毛螺菌科,李鑫萍^[14]在研究乳酸菌对泻剂结肠的缓解作用中发现,泻剂结肠小鼠菌群中[Eubacterium]_xylanophilum_group 的丰度显著降低且菌群结构明显紊乱;而乳酸菌干预后能使泻剂结肠小鼠粪便中[Eubacterium]_xylanophilum_group 丰度显著增加,肠道稳态恢复。还有研究表明,[Eubacterium]_xylanophilum_group 可能与支链氨基酸和短链脂肪酸的产生有关^[15-16]。这为淡豆豉异黄酮成分的进一步开发与利用提供一定的参考价值。

综上,染料木素和大豆苷元能够改变大鼠肠道菌群的结构和组成,主要表现在抑制拟杆菌门中部分细菌生长,促进厚壁菌门相关细菌繁殖。根据实验结果,最终选定了染料木素-大豆苷元(1:1)给药 21 d 的方式进行给药来调控大鼠肠道菌群中乳杆菌的丰度,但体内 β-葡萄糖苷酶和 II 相代谢酶的丰度,以及糖苷及苷元在体内的代谢是否受到乳杆菌的影响还有待于进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 罗曼. 染料木素对小鼠多卵巢综合征的治疗作用及其机制的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2020.
- [2] 韩晓乐, 滕晓涵, 许怡, 等. 大豆苷元防治心脑血管疾病的研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2017, 44(12): 1093-1097.
- [3] Liu J L, Chang R R, Zhang X B, *et al.* Non-isoflavones diet incurred metabolic modifications induced by constipation in rats via targeting gut microbiota [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 3002.
- [4] Yao Y, Ma X, Li T, *et al.* Quantification of isoflavone glycosides and aglycones in rat plasma by LC-MS/MS: Troubleshooting of interference from food and its application to pharmacokinetic study of *Semen Sojae Praeparatum* extract [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 161: 444-454.
- [5] Zhou B L, Yuan Y T, Zhang S S, *et al.* Intestinal flora and disease mutually shape the regional immune system in the intestinal tract [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 575.
- [6] Brennan C A, Clay S L, Lavoie S L, *et al.* *Fusobacterium nucleatum* drives a pro-inflammatory intestinal microenvironment through metabolite receptor-dependent modulation of IL-17 expression [J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1987780.
- [7] 张娟红, 张雅婷, 张军民, 等. 急进高原后肠道菌群介导的溴吡斯的明体内代谢研究 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(3): 428-433.
- [8] Yeo S K, Liong M T. Effect of ultrasound on the growth of probiotics and bioconversion of isoflavones in prebiotic-supplemented soymilk [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(3): 885-897.
- [9] Rekha C R, Vijayalakshmi G. Bioconversion of isoflavone glycosides to aglycones, mineral bioavailability and vitamin B complex in fermented soymilk by probiotic bacteria and yeast [J]. *J Appl Microbiol*, 2010, 109(4): 1198-1208.
- [10] Ren C C, Dokter-Fokkens J, Figueroa Lozano S, *et al.* Lactic acid bacteria may impact intestinal barrier function by modulating goblet cells [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2018, 62(6): e1700572.
- [11] Kamaladevi A, Ganguli A, Balamurugan K. *Lactobacillus casei* stimulates phase-II detoxification system and rescues malathion-induced physiological impairments in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2016, 179: 19-28.
- [12] Lundberg D S, Yourstone S, Mieczkowski P, *et al.* Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing [J]. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 999-1002.
- [13] Stubbendieck R M, Straight P D. Multifaceted interfaces of bacterial competition [J]. *J Bacteriol*, 2016, 198(16): 2145-2155.
- [14] 李鑫萍. 乳酸菌对泻剂结肠的缓解作用探究 [D]. 无锡: 江南大学, 2021.
- [15] Zhang L, Yue Y S, Shi M X, *et al.* Dietary *Luffa cylindrica* (L.) Roem promotes branched-chain amino acid catabolism in the circulation system via gut microbiota in diet-induced obese mice [J]. *Food Chem*, 2020, 320: 126648.
- [16] Wang Y B, Xie Q H, Sun S, *et al.* Probiotics-fermented *Massa Medicata Fermentata* ameliorates weaning stress in piglets related to improving intestinal homeostasis [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(24): 10713-10727.

[责任编辑 李亚楠]