

文章编号:1001-6880(2014)10-1654-06

# 茶多酚的提取及其对抗生素所致肠道菌群失衡的调整和预防作用

张 凯,关家伟,季 煜,刘艳艳,杨泰浩,姜 涛,吴大畅\*

大连医科大学生物技术系,大连 116044

**摘要:**为评价茶多酚对抗生素所致小鼠肠道菌群失衡的调整和预防作用,采用 $ZnCl_2$ 沉淀,乙酸乙酯萃取法提取茶多酚,HPLC检测提取效果;将BALB/c小鼠随机分为正常对照、失调模型、预防和治疗组,定期留取粪便,以自主改进法提取粪便细菌基因组总DNA,PCR-DGGE获得肠道菌群分子指纹图谱,进行相似性、多样性及主要差异条带序列的分析。结果表明提取茶多酚中有效成分EGCG的含量为42.67%;改进的溶菌酶法可有效对粪便细菌总DNA进行提取并保证下游分析顺利开展;DGGE分析显示治疗组和预防组电泳条带与正常对照组比较差异较小( $P < 0.05$ ),提示茶多酚对抗生素所致肠道菌群失衡具有一定的调整和预防作用,预防效果更佳。

**关键词:**茶多酚;EGCG;高效液相色谱;PCR-DGGE;肠道菌群

中图分类号:Q939

文献标识码:A

## Extraction of Tea Polyphenols and Its Regulative and Preventive Effects on Dysbiosis of Intestinal Flora of Mice Caused by Antibiotics

ZHANG Kai, GUAN Jia-wei, JI Yu, LIU Yan-yan, YANG Tai-hao, JIANG Tao, WU Da-chang\*

Department of Biotechnology, Dalian Medical University, Dalian 116044, China

**Abstract:** In order to study the regulative and preventive effects of tea polyphenol on intestinal flora imbalance of mice caused by antibiotics,  $ZnCl_2$  precipitation, ethyl acetate extraction method was used to extract tea polyphenols, high performance liquid chromatography (HPLC) method was used to detect extraction results; BALB/c mice were randomly divided into 4 groups: normal control group, imbalanced model group, preventive group and treatment group, regularly to keep feces. The independently improved method was adopted to extract faecal total bacterial genome DNA and PCR-DGGE technique was used to obtain the intestinal flora molecular fingerprint. Similarity analysis, diversity analysis and sequence analysis of the different bands were then carried out. The results demonstrated that the content of epigallocatechin gallate (EGCG) as an active ingredient in extract of tea polyphenols was 42.67%; The improved lysozyme method can effectively extract faecal bacteria total DNA and ensure the downstream analysis technology to carry out smoothly; In the DGGE analysis, bands in treatment group, preventive group and control group had small degrees of difference ( $P < 0.05$ ). All above results indicated that tea polyphenol had certain adjustment and preventive effects on intestinal flora imbalance caused by antibiotics and the preventive effect was proved to be better than the adjustment effect.

**Key words:** tea polyphenols; EGCG; HPLC; PCR-DGGE; intestinal flora

抗菌药物是防治感染性疾病的主要手段,在抗菌药物的临床应用中,过多使用和滥用情况已很突出,抗生素相关性腹泻(AAD)、二重感染等报道日益增多<sup>[1]</sup>。此外,抗生素滥用加剧细菌耐药已成为全世界面临的严重问题。因此,合理使用抗生素、抗生素-天然产物(主要是益生元)配伍使用及寻找抗

生素的替代品用于感染性疾病的治疗具有重要理论和应用价值。

茶多酚(Tea Polyphenols, TP)是茶叶中多羟基酚类化合物的总称,含量约占茶叶干重20%~30%。大量研究表明,TP具有极强的抗自由基和抗菌、抗病毒、抗肿瘤、防治心血管疾病等作用<sup>[2]</sup>,研究价值和应用前景良好。儿茶素类是TP的主体组分,约占65%~80%,是其药理作用最为显著的部分,其中表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)含量最高<sup>[3]</sup>,且其抗自由基等活性也最为突出。茶多酚

提取物容易获得且价格低廉,如能够与抗生素联合使用,既达到抗感染的目的,又保证肠道菌群的平衡,将对促进健康、提高全民生活质量具有重要意义。

本实验对茶多酚进行提取,通过 HPLC 对茶多酚中有效成分 EGCG 进行检测。方法中所使用的均为无毒或毒性较小的试剂,保证后续进行动物体内实验结果的可靠性。传统的培养技术对肠道菌群的检测周期长、灵敏度低、重复性差,而且肠道中大部分微生物属于厌氧或兼性厌氧菌,对培养条件要求极为苛刻,体外培养十分困难。基于此,本实验对文献报道的粪便细菌 DNA 提取方法进行了改良,建立了一种简便、快捷、有效的 DNA 提取方法,并采用分子微生态学 PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 技术评价茶多酚对改善和预防抗生素所致小鼠肠道菌群失衡的作用,以期为进一步推广应用茶多酚提供实验依据和理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

SPF 级,体重( $20 \pm 2$ )g 雌性 BALB/c 小鼠 24 只,由大连医科大学实验动物中心提供[动物合格证号:SCXK(辽)2008-0002]。

#### 1.1.2 主要试剂

绿茶(特级,福建当年产);溶菌酶(Amresco, L0663);蛋白酶 K(Merck, 1245680100);表没食子儿茶素没食子酸酯标准品(批号:100422);头孢拉定(修正药业集团股份有限公司,批号:100608)溶于无菌水,制成 25 mg/mL 的头孢拉定溶液;PCR 引物由大连宝生物公司合成,Ex Taq DNA 聚合酶购自大连宝生物公司,丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺购自美国 Sigma 公司;去离子甲酰胺、尿素、四甲基乙二胺(TEMED)、溴化乙锭(EB)等购自上海生物化学试剂工程公司;乙醇(色谱纯),乙腈(色谱纯)。

#### 1.1.3 主要仪器

DCode 变性梯度凝胶电泳系统(大连竟迈生物科技有限公司),PCR2400 循环仪(Thermo, USA),凝胶成像系统(大连竟迈生物科技有限公司),微量核酸蛋白测定仪(NanoVue, USA),FA2004 分析天平(上海越平科学仪器有限公司),CT15RT 高速冷冻离心机(上海天美科学仪器有限公司),电泳仪

(大连竟迈生物科技有限公司),PHs-3C 精密 pH 计(上海精密科学仪器有限公司),离心浓缩仪(Thermo Scientific ISS110),索氏提取器(上海矩源机械设备有限公司),高效液相色谱仪(Waters 1525 HPLC)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 茶多酚的提取

参考文献<sup>[4]</sup>方法并加以改进:准确称取 30 g 茶叶末于索氏提取器中,加入 300 mL 70% 乙醇,70 ℃ 条件下回流 2 h。移取浓缩后的茶多酚提取液 10 mL 于小烧杯中,加入 0.415 mol/L ZnCl<sub>2</sub> 水溶液,摇匀,用质量分数 15% NaHCO<sub>3</sub> 水溶液调节为 pH = 6.0,离心得茶多酚—锌盐沉淀,用蒸馏水洗涤沉淀 2 次后转移至烧杯中,加入 2 倍体积的蒸馏水混匀,再加入 2 倍体积的 2 mol/L 硫酸溶液,使沉淀物溶解,离心去除少量胶状沉淀。茶多酚酸转移液用 15% NaHCO<sub>3</sub> 溶液调节 pH = 5.0,再用乙酸乙酯在室温下分两次萃取,合并萃取液(20 ℃ 以下,转溶 15 min)。在乙酸乙酯相中加入质量分数为 2% 的维生素 C 水溶液(用柠檬酸调节 pH 为 3.0),两者体积比为 2:1,洗涤两次。60 ℃ 减压浓缩酯相,离心浓缩后得到茶多酚粉末。

#### 1.2.2 HPLC 检测茶多酚

精密称取 1.2.1 制备的茶多酚粉末 100 mg 溶于 2 mL 去离子水中,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取滤液,即得质量浓度为 50 g/L 的供试品溶液。以 0.2 mg/mL EGCG 为标准品,处理方法同上。色谱条件:色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm);流动相:A 为 2% 乙酸水溶液,B 为乙腈;梯度洗脱:0 ~ 20 min,5% B;20 ~ 40 min,30% B;40 ~ 50 min,70% B;50 ~ 55 min,100% B;柱温:30 ℃;检测波长:280 nm;流速:0.8 mL/min;进样量:20 μL。茶多酚主要成分的定量分析结果通过和标准品检出时间和波峰的峰面积对比得到。

#### 1.2.3 小鼠模型的建立与样品采集

将 24 只 BALB/c 小鼠随机均分 4 组。分别为正常对照组(0.2 mL/d 的蒸馏水连续灌胃 7 d)、失调模型组(头孢拉定 0.2 mL/d 连续灌胃 7 d)、治疗组(头孢拉定 0.2 mL/d 的剂量连续灌胃 7 d 后以 0.5 g/Kg/d 量的茶多酚灌胃 7 d)和预防组(与治疗组相反药物使用顺序灌胃)。于四组小鼠最后一天灌胃后采集洁净无污染的粪便一次,-80 ℃ 保存,备用。

### 1.2.4 粪便样品的预处理

称取 0.1 g 粪便于无菌 Ep 管中,加入 1 mL PBS (pH 7.4),旋窝震荡混匀,200 g 离心 5 min,取上清(冰水浴)。向沉淀中加入 1 mL 的 PBS,重复上述步骤。混合两次上清,用 300 g 离心 5 min,弃沉淀。上清用 10000 rpm 离心 8 min,沉淀菌体。以 PBS 洗涤至上清无色。-20 ℃过夜保存。

### 1.2.5 粪便细菌总 DNA 的提取

参照郑刚等<sup>[5]</sup>改进溶菌酶法并加以优化,对粪便细菌总 DNA 进行提取:取样品加入 0.8 mL 溶菌酶溶液(10 mg/mL),10 μL 蛋白酶 k(20 mg/mL),混合物在 37 ℃摇床下 200 rpm 震荡 1 h。加入经 65 ℃预热的 0.3 mL 裂解液(10% 十二烷基磺酸钠、0.1mL NaCl、0.5 mol/L Tris-HCl, pH 8.0),0.3 mL 磷酸盐缓冲液(pH 8.8),0.6 mL 氯仿-异戊醇(体积比 24:1),65 ℃水浴 10min,每隔 2~3 min 上下颠倒震荡 30 s。5000 rpm 离心 3 min 后小心吸取上清转入另一 2 mL 离心管中,并加入 0.6 倍体积的异丙醇,冰水浴沉淀 15 min。然后 12000 rpm 离心 10 min,弃去液相,沉淀以 75% 乙醇(4 ℃预冷)1 mL 轻微震荡洗涤,4 ℃条件下 13000 rpm 离心 2 min,待乙醇彻底挥发后,加入 100 μL TE 缓冲液溶解 DNA。取 1 μL 于微量核酸蛋白测定仪上测定其 DNA 浓度,并通过 1% 琼脂糖凝胶(含 EB 0.5 g/mL)电泳检测其质量。于-20 ℃保存备用。

### 1.2.6 16S rRNA 片段的 PCR 扩增

利用通用引物扩增所有细菌 16S rRNA 基因的 V3 可变区,引物设计时需在上游引物 5' 端加上 GC 夹。通用引物以及 GC 夹的序列如下<sup>[6]</sup>:

上游引物: GC-341F (5'-CGCCCGGGGCCGC-  
CCCGGGCGGGCGGGGCACGGGGGGCCTACGGG  
AGGCAGCAG-3') (粗体部分为 40bp“GC 夹”)

下游引物: 518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-  
3')

扩增体系(25 μL)为: 10 × Ex PCR Buffer ( $Mg^{2+}$  plus) 5 μL, dNTP mixture 4 μL, 1% BSA (1 mg/mL) 2.5 μL, 20 μmol/L 的上下游引物各 0.5 μL, 5 U/μL Ex Taq DNA 聚合酶 0.25 μL, 总 DNA 2 μL 作为模板, ddH<sub>2</sub>O 10.25 μL 补充体系至 25 μL。PCR 反应条件: 95 ℃, 5 min; 30 个循环(94 ℃ 30 s, 54 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s); 72 ℃ 7 min。PCR 产物经

1% 琼脂糖凝胶电泳检测,-20 ℃保存。

### 1.2.7 DGGE 电泳分析

参照 Walter J 等<sup>[7]</sup>方法,对 1.2.6 获得的 16S rRNA 基因的 V3 可变区的扩增产物进行 DGGE 电泳。DGGE 采用 8.0% 聚丙烯酰胺凝胶,变性梯度为 30%~50% (100% 变性剂溶液包括 40% 去离子甲酰胺和 7M 尿素)。电泳温度为 60 ℃,以 100 V 电压预电泳 10 min,再将电压调至 40 V,电泳 5 h。电泳完毕后,进行 EB 染色,利用 Phoretix 1D(Phoretix, Newcastle upon Tyne, UK)软件分析 PCR-DGGE 胶图谱<sup>[8]</sup>。包括条带数目、灰度值以及通过聚类分析显示 DGGE 图谱的相似性,各条带的聚类分析应用 UPGMA 算法进行分析。利用 Shannon-Weaver index (H') 计算条带的多样性。并采用均匀度 Evenness (E) 分析菌群分布的统一性,由于数据不服从正态分布,故利用非参数统计分析 U 检验。H' 和 E 通过以下公式获得:Shannon-Weaver index (H') = -Σ (Pi) (ln Pi), Evenness (E) = H' / ln S, 其中 Pi = ni/N, ni 为单个条带的灰度值, N 为所有条带的灰度值, S 为样品条带数目。

### 1.2.8 DGGE 图谱中部分优势条带的序列分析

切下 DGGE 图谱中清晰且亮度高的条带,放入 Ep 管中捣碎,加入 50 μL 去离子水-20 ℃过夜。90 ℃水浴 10 min,离心(10000 g, 5 min)。以上清液为模板,利用无 GC 的 V3 区引物 341F 和 518R,再次进行 PCR 反应,反应条件同 1.2.6,1% 琼脂糖电泳确认是否出现单一条带。PCR 产物由 Invitrogen(北京公司)测序,测序结果经 DNASTar 软件分析,所得序列在 GenBank 数据库中进行 Blast 比对分析。

## 2 实验结果

### 2.1 茶多酚的提取

HPLC 检测结果如图 1 所示,EGCG 的保留时间约为 13.5 min,各峰分离度较好。由样品色谱图(A)可见,所提取的茶多酚原料中除 EGCG(主峰)外,还有其他色谱峰,可能为表儿茶素没食子酸(ECG)等成分,这也与前言所述理论相符,提示茶多酚的提取效果比较好,能够进行后续实验。以样品 EGCG 峰面积与标准品峰面积之比及公式 [EGCG 含量(%) = 测得的 EGCG 平均含量/茶多酚质量 × 100%] 换算出 TP 中 EGCG 百分含量为 42.67%。

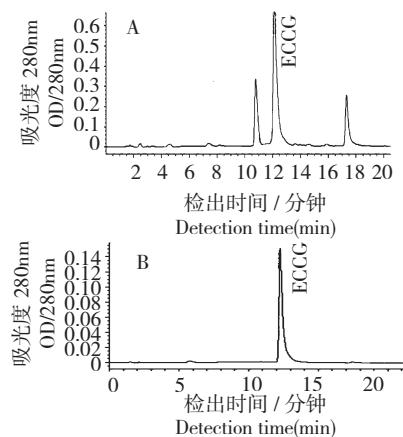


图1 茶多酚样品(A)及EGCG标准品(B)的HPLC图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of Tea Polyphenols (A) and EGCG standard (B)

## 2.2 粪便细菌总DNA的提取

使用改进溶菌酶方法提取的细菌总DNA用1%琼脂糖电泳后可在紫外灯下看到清晰的单一条带,且亮度较强,偶见上样口有少许亮带(图2),分析可能是由于在提取的过程中蛋白没有除净,这也与表1中OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub>小于1.8,提示有蛋白污染结果吻合。该污染经证实对PCR影响较小,可进行后续实验。

表1 DNA纯度和浓度检测结果

Table 1 Detection of DNA purity and concentration

方法 Method	DNA纯度 OD <sub>260 nm</sub> /OD <sub>280 nm</sub>	质量浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )
改进溶菌酶法 Improved lysozyme method	1.69 ± 0.14	122.5 ± 3.69

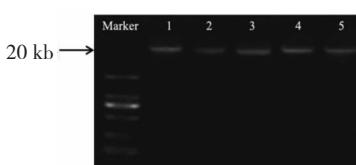


图2 粪便细菌基因组提取结果

Fig. 2 Extraction results of total DNA of fecal microorganism

1:预防组;2~3:失调模型组;4:治疗组;5:正常对照组  
1: Preventive group;2~3:Disorder model group;4:Treatment group;5:Normal control group

## 2.3 16S rRNA目的基因的PCR扩增

利用通用引物扩增各组小鼠肠道细菌16S rRNA V3区基因。目的条带片段长度约200bp(图3)。

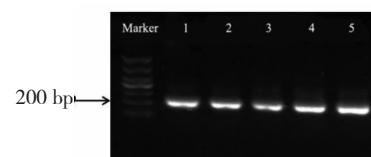


图3 V3区16S rRNA基因扩增

Fig. 3 PCR amplification of V3 region of 16S rRNA gene  
1: 预防组;2~3: 失调模型组;4: 治疗组;5: 正常对照组  
1: Preventive group;2~3: Disorder model group;4: Treatment group;5: Normal control group

## 2.4 DGGE图谱分析

各实验组小鼠肠道菌群的DGGE图谱显示,各泳道的均匀性较好(表2),通过香农指数Shannon-Weaver indexes ( $H'$ )比较肠道菌群种类的多样性差异(表2,图4、5),图谱主要分为两簇:第一簇是泳道1、4、5;第二簇是泳道2和3;簇间具有较高的相似度。结果提示经抗生素致失衡后小鼠肠道菌群发生显著改变( $P < 0.05$ ),茶多酚预防与治疗后与正常对照组比较差异明显减小,菌群多样性基本一致。

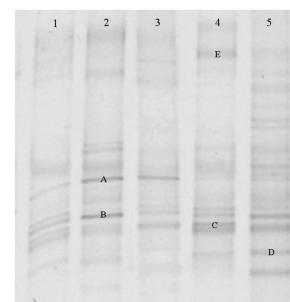


图4 各实验组DGGE图谱

Fig. 4 DGGE profiling of different experiment group

1: 预防组;2~3: 失调模型组;4: 治疗组;5: 正常对照组 A、B、C、D、E 为需切胶测序的条带  
1: Preventive group;2~3: Disorder model group;4: Treatment group;5: Normal control group Bands A, B, C, D, E were cut for sequencing

表2 各实验组微生物多样性分析

Table 2 Microbiota diversity index analysis of each group

组别 Groups	丰富度 Number of bands (S)	多样性 Shannon- Weaver index ( $H'$ )	均匀性 Evenness (E)
1	12.11 ± 0.13	2.02 ± 0.08	0.81 ± 0.02
2	11.08 ± 0.10	1.98 ± 0.06 *	0.83 ± 0.03
3	14.15 ± 0.11	1.80 ± 0.07 *	0.80 ± 0.01
4	12.10 ± 0.11	2.04 ± 0.04	0.76 ± 0.06
5	16.13 ± 0.12	2.26 ± 0.09	0.84 ± 0.10

注:与正常对照组5比较, \*  $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the normal control group 5, \*  $P < 0.05$ .

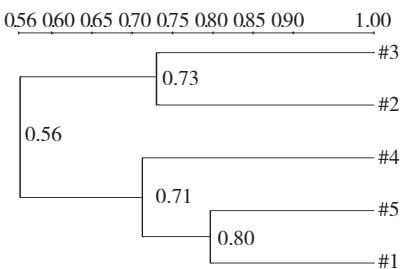


图 5 各组小鼠肠道菌群 UPGMA 相似性聚类分析

Fig. 5 Dendrogram of DGGE profiles analyzed by UPGMA method

## 2.5 测序结果分析

对 DGGE 图谱中的主要差异条带进行测序,所得结果在 GenBank 数据库中进行 Blast 比对和同源性比较,结果如表 3。

## 3 讨论

人体是一个巨大的微生态系统,尤其肠道菌群的平衡对机体健康具有重要意义,如:促进消化,抵御致病菌侵袭,营养物质的代谢吸收、维生素的摄

表 3 DGGE 主要差异条带分析结果

Table 3 Identification by sequence of V3 fragments excised from DGGE dominant bands of total microbial community

条带 Selected band	比对结果 Blast result	门 Bacteria Phylum	属 Bacteria Genus	相似性 Similarity
A	<i>Facklamia hominis</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Facklamia</i>	96%
B	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Prevotellaceae</i>	95%
C	<i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>mobilis</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Zymomonas</i>	100%
D	<i>Nitrosospira multiformis</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Nitrosospira</i>	99%
E	<i>Bacteroides vulgatus</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroides</i>	100%

取,增强机体免疫力等。多种因素可以导致肠道菌群失衡,如精神压力、饮食、服用某些药物等。临 床上,长期大量使用抗生素进行治疗的患者极易造成肠道菌群的失调,因此寻找一种有效且副作用小的治疗与预防药物具有十分重要的意义。

本实验对茶多酚的提取以及其对抗生素所致肠道菌群失调的调整和预防作用进行了研究,结果表明,使用  $ZnCl_2$  沉淀,乙酸乙酯进行萃取的方法可以有效的对茶叶中的茶多酚进行提取,且 HPLC 检测茶多酚中的有效成分 EGCG 的含量可达 42.67%。使用自主改进的溶菌酶方法对粪便中细菌总 DNA 提取效果显著,后续实验中,基因组中 16S rRNA 片段可有效进行 PCR 扩增。DGGE 图谱分析显示,使用抗生素作用小鼠后,电泳条带数量和强度都有明显变化,提示肠道菌群的丰富度与多样性改变,证明抗生素的使用导致肠道内环境发生改变,引起菌群紊乱。茶多酚作用后,小鼠肠道菌群失调状况有所纠正,并且由 UPGMA 相似性聚类分析可知预防组在给茶多酚后再用抗生素致紊乱,发现其肠道菌群和正常组肠道菌群的相似度最高,说明茶多酚预防作用效果良好,并优于治疗作用。对于茶多酚发挥作用的确切靶细菌,DNA 测序及比对分析提示主要有:费克蓝姆菌、产黑色普雷沃菌、酵单胞菌、亚硝化螺菌、拟杆菌。已有研究表明,拟杆菌是肠道绝对优

势菌,这种优势菌通过自身的定植直接抑制其他有害菌群的黏附,而且在菌群失调时重新引入拟杆菌,可以尽快使宿主肠道内微生态体系恢复平衡状态<sup>[9]</sup>,本研究结果表明茶多酚可以发挥益生元的作用促进肠道益生菌的增殖,进而促进肠道菌群平衡的重建。

茶叶中的茶多酚廉价易得,且属于天然产物,对机体的毒副作用小,因此具有极大的商业价值。本实验进一步证明了茶多酚在肠道菌群失衡中的作用,为其在临床治疗上的应用提供了一定的理论基础。相信茶多酚在工业生产以及临 床上会有更加广阔的应用前景。

## 参考文献

- 1 Zhou XY(周雪艳). Pathogenesis of antibiotic associated diarrhea. *Chin J Microecol* (中国微生态学杂志), 2004, 16: 376.
- 2 Wang JS, Luo HT, Wang PW, et al. Validation of green tea polyphenol biomarkers in a phase II human intervention trial. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46: 232-240.
- 3 Wang D(王东), Sui LH(隋丽华), Li N(李楠), et al. Study on quality standard for compound tea polyphenols lini-ments. *Chin New Drugs J*(中国新药杂志), 2007, 16: 1879-1881.

(下转第 1704 页)