

枸杞子提取物对小鼠肠道菌群失衡的调整作用

刘云婷, 徐巍, 辛毅, 李新莉*

大连医科大学生物技术系, 大连 116044

摘要: 本研究旨在探讨枸杞子不同浓度提取物对小鼠肠道菌群失衡的调整作用, 为枸杞子的进一步开发利用提供理论依据。使用抗生素建立肠道菌群失衡模型, 将小鼠随机分为正常对照组、枸杞子提取物高浓度组、低浓度组、模型组和自然恢复组, 以双歧杆菌、乳酸杆菌、肠杆菌、肠球菌等肠道正常菌群为对象, 利用传统菌落计数法研究各组肠道菌群失衡及恢复调整情况。枸杞子提取物对乳酸杆菌和双歧杆菌的生长具有恢复作用, 且低浓度提取物的增殖作用优于高浓度, 而对肠球菌和肠杆菌的作用并不明显。枸杞子提取物对小鼠肠道菌群失衡有一定的调整作用, 能够纠正抗生素相关性菌群失调。

关键词: 枸杞子; 肠道菌群; 调整作用

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.07.027

Regulating Effects of Fructus Lycii Extracts on Dysbiosis of Intestinal Flora of Mice

LIU Yun-ting, XU Wei, XIN Yi, LI Xin-li*

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

Abstract: To investigate the regulating effects of different concentrations of Fructus Lycii extracts on antibiotics-induced dysbiosis of intestinal flora in mice, to supply theoretical basis for further development and utilization of Fructus Lycii. The mice model of intestinal dysbiosis was established by treating with antibiotics. Mice were randomly divided into five groups: normal control group, high concentration extract group, low concentration extract group, model group and spontaneous recovery group. Taking *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterobacteria* and *Enterococcus* as investigating targets, traditional culturing method was used to examine the predominant microbial population changes of intestinal flora. Low concentration extracts of Fructus Lycii showed promoting effects on *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*, which was better than that of high concentration group. However, the promoting effects on *Enterobacteria* and *Enterococcus* were unobvious. Based on these results, it was concluded that Fructus Lycii extracts can regulate intestinal flora and correct intestinal microbe dysbiosis caused by antibiotics.

Key words: Fructus Lycii; intestinal flora; regulating effects

人体肠道中存在着大量微生物, 其中超过 99% 都是细菌, 人体的健康程度与肠道菌群结构息息相关。在长期的进化过程中, 肠道菌群经过个体的适应和自然选择, 菌群中不同种类之间, 菌群与宿主之间, 菌群、宿主与环境之间, 始终处于一种动态平衡状态中, 形成了一个互相依存, 相互制约的系统。因此, 人体在正常情况下, 菌群结构相对稳定, 对宿主表现为不致病, 而一旦打破了这种平衡, 就有可能产生腹泻、阴道感染、人体免疫力降低、血清胆固醇增高甚至提高了癌症和肿瘤的发生率^[1]。在食品中

添加益生元成为解决这一问题的重要途径^[2]。枸杞子(Fructus Lycii)是茄科植物枸杞的干燥成熟果实, 素有“红宝”之称, 含有枸杞多糖、甜菜碱、核黄素、甾醇、芸香苷和枸杞叶蛋白等有效成分以及多种氨基酸和微量元素^[3], 具有滋补肝肾, 益精明目的功效, 是历代医药学家推崇的上等滋补珍品。近年来用现代医药学的手段对枸杞子的研究日渐活跃, 证明了枸杞子对人体具有多种有益作用和疗效^[4]。本实验考察了不同浓度枸杞子提取物对抗生素相关性菌群失衡小鼠的调整作用, 检测小鼠粪便主要优势菌数量的变化, 以明确枸杞子是否可以成为新一代的益生元, 为其进一步开发利用提供理论依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

UVS-1 涡旋振荡器(北京优晟联合科技有限公司);HC-3018R 高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学有限公司);BCM 洁净操作台(苏州真田洁净设备有限公司);HPX-9052MBE 电热恒温培养箱(常州诺基仪器有限公司);高压蒸汽灭菌锅(创博环球生物科技有限公司);恒温水浴锅(金坛市华特实验仪器有限公司)。

1.2 试剂

枸杞子(银川宁杞红土特产有限公司);头孢拉定胶囊(长春迪瑞制药有限公司,批号:H20063308,规格:每粒0.25 g);LBS培养基(乳酸杆菌选择培养基)、BS培养基(双歧杆菌选择培养基)、EMB培养基(肠杆菌选择培养基)、EC培养基(肠球菌选择培养基)、胰蛋白胨(青岛海博生物技术有限公司);酵母提取物(OXIOD,进口分装);琼脂粉(北京奥博星生物技术有限责任公司);氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠等均为分析纯(上海国药集团化学试剂有限公司)。

1.3 动物

SPF级BALB/c小鼠,雌雄各半,体重18~22 g,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。

2 实验方法

2.1 枸杞子提取物的制备

称取干燥枸杞子100 g,加水1 L浸泡1 h,煎煮1 h,过滤,滤渣加同量水再煎一次,合并滤液蒸发浓缩至250 mL,生药浓度为0.4 g/mL。

2.2 药品配制

头孢拉定用蒸馏水配制成10 mg/mL。以生药浓度为0.4 g/mL的枸杞子溶液为高浓度提取物。取10 mL枸杞子高浓度提取物加入10 mL蒸馏水,配置生药浓度为0.2 g/mL的枸杞子低浓度提取物。

2.3 分组与处理

动物给药剂量参照公式 $d_B = d_A \times (K_B/K_A)$ 。其中, d_A (d_B)为A(B)种动物每千克体重给药剂量; K_A (K_B)为A(B)种动物的折算系数。

40只小鼠随机分为5组:正常对照组(N)、枸杞子提取物高浓度组(H)、低浓度组(L)、模型组(C)和自然恢复组(R),每组8只。除正常对照组

外,其他组均灌服10 mg/mL头孢拉定溶液7 d,0.2 mL/d建立肠道菌群失调模型。第8 d分别用0.4 g/mL枸杞子提取物、0.2 g/mL枸杞子提取物、10 mg/mL头孢拉定溶液、蒸馏水以0.2 mL/d持续灌胃7 d。分别在实验的0、7、14 d收取每只小鼠粪便,于-80 °C保存备用。

2.4 肠道菌群检测

2.4.1 标本处理

取小鼠粪便0.2 g于无菌试管(编号1),加入1.8 mL无菌PBS溶液(pH 7.4),混匀至粪便均质化,此为10倍稀释。取7个无菌试管(编号为2~8),各加入4.5 mL无菌PBS溶液,然后从管1中取出0.5 mL粪便均质化溶液,放入管2,充分混匀,即为100倍稀释,依次进行倍比稀释,至 10^8 倍稀释备用。

2.4.2 标本滴种

严格按说明书要求,配制LBS、BS、EMB、EC培养基,115 °C高压灭菌15 min,趁热灌注平板,冷却后,从高稀释度开始(见2.4.1),每次吸取20 μ L菌液滴种于各平皿上,滴种结束后,用涂布棒将液体涂匀。每个稀释倍数重复3次。EMB和EC培养基倒置,37 °C培养24 h后观察结果;BS培养基用厌氧罐法培养24 h后观察结果;LBS培养基用厌氧罐法培养46 h后观察结果。

2.4.3 活菌计数

对菌落个数为10~100的平板进行计数^[5],结果以lg cfu/g的形式表示(见表1)。

2.5 数据分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 10.0进行多组间one-way ANOVA分析统计学差异,* $P < 0.05$ 有显著性差异,** $P < 0.01$ 有极其显著性差异。

3 实验结果

如表1所示。灌服头孢拉定后肠道各细菌与正常对照组相比均有显著性变化(a),提示建模成功。使用不同浓度的枸杞子提取物对肠道菌群失调小鼠进行干预,结果显示枸杞子提取物(H和L)能够促进菌群失调小鼠肠道内肠杆菌的生长(b);针对乳酸杆菌和双歧杆菌的促生长作用更加显著(c),枸杞子提取物的作用均明显优于自然恢复组(d),且低浓度对二细菌的增殖作用高于高浓度;而对肠球菌的促生效果不明显。由上可知,枸杞子提取对乳酸杆菌和双歧杆菌生长促进作用明显。

表 1 各组粪便标本菌群检测结果($\bar{x} \pm s, \lg \text{cfu/g}$)
Table 1 Detection of bacteria in stool samples($\bar{x} \pm s, \lg \text{cfu/g}$)

组别 Group	肠杆菌 <i>Enterobacteria</i>	肠球菌 <i>Enterococcus</i>	乳酸杆菌 <i>Lactobacillus</i>	双歧杆菌 <i>Bifidobacterium</i>
高浓度提取物组 High concentration extract group (H)	10.61 ± 0.008 ^b	10.70 ± 0.020	8.04 ± 0.020 ^{c,d}	10.15 ± 0.046 ^{c,d}
低浓度提取物组 Low concentration extract group (L)	10.51 ± 0.015 ^b	10.69 ± 0.024	8.27 ± 0.030 ^{c,d}	10.37 ± 0.023 ^{c,d}
模型组 Model group (C)	10.45 ± 0.027 ^a	10.62 ± 0.043 ^a	7.72 ± 0.001 ^a	9.77 ± 0.087 ^a
自然恢复组 Spontaneous recovery group (R)	10.64 ± 0.022	10.67 ± 0.031	7.86 ± 0.030	9.91 ± 0.030
正常对照组 Control (N)	10.69 ± 0.013	10.75 ± 0.026	8.76 ± 0.053	10.48 ± 0.027

注:a:与正常对照组相比,** $P < 0.01$;b:与模型组相比,* $P < 0.05$;c:与模型组相比,** $P < 0.01$;d:与自然恢复组相比,** $P < 0.01$ 。

Note:a:Compare with control,** $P < 0.01$;b:Compare with Model group,* $P < 0.05$;c:Compare with Model group,** $P < 0.01$;d:Compare with spontaneous recovery group,** $P < 0.01$ 。

4 讨论

抗生素是临床治疗感染性疾病的主要药物,但长期使用会导致肠道微生态失调,造成临床伴发性腹泻,引起二重感染症状,给治疗带来困难^[6]。益生元在人体内不消化或难消化,通过促进肠道内双歧杆菌、乳酸杆菌等益生菌的增殖而起到改善肠道菌群环境的作用^[7],对宿主的健康具有促进作用。大量文献表明^[8,9],中药作为益生元能够促进肠道正常有益菌群的生长,维护机体微生态平衡。

肠道菌群可分为深层的紧贴黏膜表面的膜菌群,主要由双歧杆菌和乳酸杆菌等共生厌氧菌组成;中层为粪杆菌、消化链球菌等厌氧菌;表层的细菌可游动,称腔菌群,主要是肠杆菌、肠球菌等需氧菌^[10]。研究表明若能增加肠道益生菌的比例,抑制有害菌的繁殖,就可以减少肠道腐败、清洁肠道、促进健康、延缓衰老^[11]。肠杆菌、肠球菌、双歧杆菌及乳酸杆菌这些优势菌群数量的变化可以作为肠道菌群失调及失调程度的判断标准。本研究选择临床常用抗生素——头孢拉定建立肠道菌群失调模型^[6],使用不同浓度枸杞子提取物对肠道菌群失调小鼠进行干预,通过测定小鼠粪便中上述4种细菌数量的变化,研究枸杞子对肠道菌群失衡的调整作用。实验结果表明,枸杞子提取物对肠道菌群失调小鼠肠道中乳酸杆菌和双歧杆菌等益生菌的生长具有明显的恢复作用,且作用效果要明显优于自然恢复组,具有显著的益生元特性。

综上,枸杞子提取物能够促进乳酸杆菌和双歧杆菌等肠道益生菌的生长,为微生态制剂的开发及中药合理使用提供了理论依据。这种中药微生态制剂可以与抗生素合用,减弱药物对益生菌的抑制和杀死作用,维持肠道菌群平衡。中药以其独特性能

如天然性、整体调节、扶正祛邪、双向调节等作用,将有可能在一定程度上解决抗生素带来的副作用,并在治病防病、调节机体免疫机能、平衡肠道微生态平衡等方面发挥一定的作用。

参考文献

- 1 Wang MJ(汪孟娟),Xu HY(徐海燕),Xin GQ(辛国芹),*et al.* Research progress on the species and functions of human probiotics. *Anim Husband Feed Sci* (畜牧与饲料科学),2013,34:62-66.
- 2 Wang JL(王俊丽),Nie GX(聂国兴). Xylo-oligosaccharides and the gut micro-ecosystem. *World Chin J Digestol* (世界华人消化杂志),2011,19:710-717.
- 3 Lv BY(吕炳义),Fan RX(樊瑞霞). The composition and function of *Lycium barbarum* L. *J Hebeu Tradit Chin Med Pharm* (河北中医药学报),1998,13:29-30.
- 4 Du Y(杜毅),Gao H(高华),Ban CJ(班长俊),*et al.* The chemical and pharmacological research progress of *Lycium barbarum* L. *Nei Mongol J Tradit Chin Med* (内蒙古中医药),2000,19:40-41.
- 5 Wu DC(吴大畅),Tu Y(涂益),Zhang CL(张翠丽),*et al.* Regulating effect of *Litsea coreana* extracts on dysbiosis of intestinal flora in mice model. *Chin J Microecol* (中国微生态学杂志),2012,24:30-32.
- 6 Li XL(李新莉),Wu DC(吴大畅),Zhang CL(张翠丽),*et al.* Comparison of the effects of lincomycin hydrochloride vs. cefradine on the intestinal bacteria of BALB/c mice. *China Pharm* (中国药房),2012,23:28-30.
- 7 Gu H(谷豪),Xia YW(夏毅伟),Wei LP(韦莉萍),*et al.* Effects of peach gum polysaccharide, resistant starch, and fructooligosaccharide on growth of intestinal probiotics in normal rats;A comparative study. *J Anhui Tradit Chin Med Coll* (安徽中医学院学报),2013,32:68-70.