

乌梅对抗生素所致小鼠肠道菌群失调的改善作用

李逸飞,马婉婷,曹园*,陈玉根,吴信华

南京中医药大学附属医院 江苏省中医院,南京 210029

摘要:本研究旨在探讨药食同源中药乌梅对抗生素所致小鼠肠道菌群失调的改善作用,为乌梅的进一步开发利用提供科学依据。构建广谱抗生素诱导的小鼠肠道菌群紊乱模型,40只ICR小鼠随机分为空白对照、模型组、乌梅低、中、高剂量组,连续灌胃15天后,采集小鼠新鲜粪便样本。采用高通量测序技术对乌梅干预前后小鼠的肠道菌群进行16S rRNA基因测序,对测序结果进行生物信息学分析,并检测体质量和炎性因子改变。结果显示,中、高剂量乌梅可以显著降低小鼠体重;中剂量乌梅可以调节抗生素引起的TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的变化至正常水平;病理切片显示高剂量乌梅对胃有一定刺激作用。对菌群结构的分析表明乌梅可以部分改善抗生素引起的菌群紊乱的状况:在门水平上,中、低剂量的乌梅显著降低变形菌门的相对丰度;在属水平上,中、低剂量的乌梅显著上调 *Lactobacillus* ($P = 0.001, P = 0.000$) 和 *Faecalibaculum* ($P = 0.005, P = 0.038$), 高、低剂量的乌梅显著上调 *Bifidobacterium* ($P = 0.000, P = 0.000$) 和 *Blautia* ($P = 0.049, P = 0.000$) 的相对丰度。本研究从肠道微生态的视角为乌梅的临床应用提供科学依据,并揭示其作为肠道微生态调节剂产品的前景。

关键词:乌梅;抗生素;肠道菌群;高通量测序

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)5-0717-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.5.001

Ameliorating effect of Mume Fructus on dysbiosis of murine gut microbiota induced by antibiotics

LI Yi-fei, MA Wan-ting, CAO Yuan*, CHEN Yu-gen, WU Xin-hua

The Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

Abstract: This study aimed to investigate the ameliorating effects of Mume Fructus (MF) on dysbiosis of murine gut microbiota induced by antibiotics, and to supply scientific basis for further development and utilization of Mume Fructus. Forty ICR mice were randomly divided into a blank group of 8 and an intestinal dysbiosis group of 32, which were randomly divided into model, high-dose MF (H), medium-dose MF (Me) and low-dose MF (L) groups. Thirty-two mice with intestinal dysbiosis received respectively treatment for 15 days, and simultaneously antibiotics (ig) from the tenth day. The murine weight was monitored, the pathological changes of tissues were observed by hematoxylin and eosin (HE) staining, and the murine gut microbiota determined by high-throughput sequencing and inflammatory factors detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Compared with normal group, H and Me groups reduced the average body weight and reversed the weight gain induced by antibiotics. The Me group restored the inflammatory markers, TNF- α , IL-1 β and IL-6 to normal. Observations from a HE staining experiment demonstrated that H group had gastric irritation. At the phylum level, compared with the model group, the relative abundance of Proteobacteria had decreased in the L and Me groups. Meanwhile, at the genus level, the relative abundance of *Lactobacillus* and *Faecalibaculum* had increased in the L and Me groups, and those of *Bifidobacterium* and *Blautia* had increased in the L and H groups. This study provided a scientific basis for clinical medication of MF from the perspective of microecology, and revealed its potential as intestinal microecological modulator.

Key words: Mume Fructus; antibiotics; gut microbiota; high-throughput sequencing

收稿日期:2020-12-30

接受日期:2021-04-08

基金项目:江苏省中医药局科技项目(JD201514);江苏省中医院

科技项目(Y18048)

*通信作者 E-mail:caoy@126.com

药食同源根植于中医药文化,指药品和食品均来源于自然界,在中医理论指导下,以初生和次生代谢产物为物质基础,起调养、康复、保健作用。药食

同源体现中医药独特优势,在疾病治疗中起协同作用、在治未病和疾病康复中起重要作用。在对传统药食两用物质的安全性充分评估的基础上,我国制定了《既是食品又是药品的物品名单》(以下简称《名单》),收载 93 种具有传统食用习惯,且列入国家中药材标准(包括《中华人民共和国药典》及相关中药材标准)的中药。现阶段,对药食同源物质的开发亟需用科学理论阐明其功效及分子机制,而药食同源物质起效和缓,不适合采用化学药物-靶标的研发思路,肠道微生态为我们提供了全新视角。

人体的胃肠道,富集着数以亿万计的微生物群,这些微生物所编码的基因组是人体本身基因的 50 ~ 100 倍,被誉为人体“第二基因组”。肠道菌群作为人体的“特殊器官”,与人体互利共生,在人体物质、能量代谢,神经、免疫调控,以及抵御病源微生物的侵入等方面发挥重要作用。大量研究表明,菌群失调(菌群结构的改变)与多种疾病的发生发展密切相关,如癌症、感染性疾病、心血管疾病、精神系统疾病等。药食同源物质通过调节肠道菌群,发挥养生保健和防病治病的作用。

乌梅为蔷薇科植物梅 *Prunus mume* (Sieb.) Sieb. et Zucc. 的干燥近成熟果实,经熏制或烘制等方法加工而成。乌梅有悠久的药食历史,始载于《神农本草经》,列为中品;为《名单》收载品种,广泛融入日常饮食和保健,在日本更甚,有“喝早茶的时候请享用梅干”的俗语。本品性酸、涩、平,归肝、脾、肺、大肠经,具有敛肺、涩肠、生津、安蛔等功效。研究表明,乌梅富含有机酸、酚酸、黄酮、萜类和甾体等成分,现代药理学研究证实乌梅具有抑菌、镇咳、镇静催眠及抗惊厥、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化等多种药理作用^[1,2]。本研究构建广谱抗生素诱导的小鼠肠道菌群紊乱模型,采用高通量测序技术对乌梅干预前后小鼠的肠道菌群进行 16S rRNA 基因测序,并检测体质量和炎性因子改变,研究乌梅对抗生素所致肠道菌群失调的调节作用,从肠道微生态的角度为乌梅的药食应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 ICR 小鼠 40 只,体重 18 ~ 22 g,雄性,由扬州大学比较医学中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(苏)2017-0007。于南京中医药大学附属医院基础药理室 SPF 级动物饲养室饲养(实验单位使用许可证编号 SYXK(苏)2017-0069),温度 22 ± 2

℃,湿度 55% ± 10%,12 h 明暗交替。遵循南京中医药大学附属医院实验动物伦理委员会的相关规定和要求。

1.2 试剂与仪器

硫酸庆大霉素(批号 EZ2811A396, 德国 Bio-FROX 公司);头孢噻肟钠(批号 E612BA0041, 中国 BBI 生命科学有限公司);MetaVx™ 文库构建试剂盒(Invitrogen, Carlsbad, CA);纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司);Agilent 2100 生物分析仪(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA);Qubit 2.0 Fluorometer(Invitrogen, Carlsbad, CA);Illumina MiSeq(Illumina, San Diego, CA, USA)。

1.3 动物分组与给药

40 只 ICR 小鼠随机分为空白对照组(blank group, B)、模型组(model group, M)、乌梅高剂量组(high-dose group, H)、乌梅中剂量组(medium-dose group, Me)、乌梅低剂量组(low-dose group, L),每组 8 只。B 组:生理盐水 0.2 mL/次,2 次/天;M 组:抗生素混合溶液(硫酸庆大霉素 7.5 mg/次 + 头孢噻肟钠 30 mg/次)0.2 mL/次,2 次/天;乌梅 L、Me、H 组:剂量分别为 0.78、1.56、7.8 g/kg/d 的乌梅水煎液(折合临床最高剂量的 0.5、1、5 倍),0.2 mL/次,2 次/天。

每组均灌胃给药,M 组连续给生理盐水 9 天,其余组预防给药 9 天,第 10 天开始同时给予抗生素混合溶液,于第 15 天早上称重、无菌取其粪便、摘眼球取血并脱颈处死。每天给药前观察粪便形态。

1.4 取样和检测指标

1.4.1 药物干预对小鼠体重的影响

于第 0、3、7、11、15 天分别称体重,记录重量。

1.4.2 药物干预对小鼠炎性因子的影响

末次给药后各组小鼠禁食不禁水,无菌收集小鼠新鲜粪便。迅速装入无菌冻存管中转移至 -80 ℃ 冰箱,备用。

小鼠眼眶取血,室温放置 2 h 再离心,3 000 rpm,10 min,取上清液即得,-20 ℃ 储存备用;血清中肿瘤坏死因子 α(TNF-α)、白介素 1β(IL-1β)、白介素 6(IL-6)均采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)进行测定。

1.4.3 HE 染色及组织病理

小鼠取血后处死,取出心、肝、脾、肺、肾、肠组织,用生理盐水洗净表面浮血,滤纸吸干,置于福尔马林固定。组织病理学检查,将组织从福尔马林溶

液中取出,脱水,石蜡包埋,切片,常规HE染色、脱水、二甲苯透明,以中性树胶封片,光学显微镜下观察组织并拍摄。由2名经验丰富的病理医师阅片。

1.4.4 肠道菌群 Illumina MiSeq 测序分析

本实验菌群结构的高通量测序和分析由苏州金唯智科技有限公司完成。

取小鼠粪便提取DNA,提取方法参照Qubit ds-DNA Assay Kit(Life Technologies,Q328520)试剂盒说明书。提取得到的DNA样品经Qubit 2.0 Fluorometer(Invitrogen,Carlsbad,CA)检测浓度,使用MetaVxTM文库构建试剂盒(GENEWIZ,Inc.,South Plainfield,NJ,USA)构建测序文库。

30~50 ng DNA为模板,PCR扩增细菌16S rDNA上V3~V4可变区,上游引物包含“CCTACGGRRBGCASCAGKVRVGAAT”序列,下游引物包含“GGACTACNVGGGTWTCTAATCC”序列。使用Agilent 2100生物分析仪(Agilent Technologies,Palo Alto,CA,USA)检测文库质量,并进行Qubit定量。DNA文库混合后,上机测序,由MiSeq Control Software(MCS)读取序列信息。双端序列去杂,拼接,去除嵌合体序列,使用Vsearch(1.9.6)进行序列聚类(序列相似性设为97%),参考Silva132数据库,得到每个OTU对应的物种信息,物种比对注释使用RDP classifier软件,保留置信区间大于0.7的注释结果。对测得的有效数据进行分类单元聚类、OTUs丰度、alpha/beta多样性分析。采用LEfSe分析,比较抗生素及不同剂量乌梅引起的肠道菌群丰度在各物种分类水平上的差异。利用PICRUSt软件将测序得到的菌群组成“映射”

到Greengenes数据库中,对菌群功能和代谢途径进行预测分析。

1.4.5 数据处理及统计学方法

使用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本均数比较采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 药物干预对小鼠体重的影响

于第0、3、7、11、15天分别称量小鼠体重,并记录,结果(图1)显示抗生素可显著增加小鼠的体重,而中剂量和高剂量乌梅可以显著降低小鼠体重,提示乌梅有减重的可能。

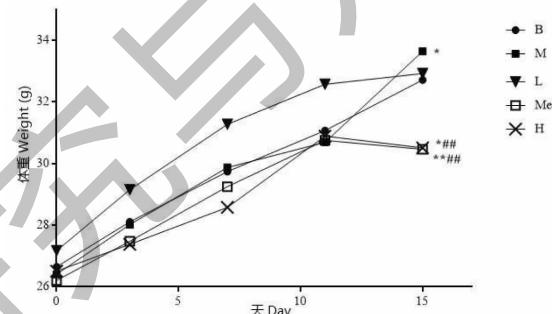


图1 乌梅对小鼠体重的影响

Fig. 1 The effect of Mume Fructus on the weight of mice

2.2 药物干预对小鼠系统炎症水平的影响

采用血清多种细胞因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)反映系统炎症水平。实验结果发现,抗生素引起小鼠血清TNF- α 极显著上升,对IL-1 β 、IL-6有下调作用,但不具有统计学意义,中剂量乌梅可以调节TNF- α 、IL-1 β 、IL-6至正常水平,低、高剂量乌梅对细胞因子的改善不明显。

表1 乌梅对小鼠血清中TNF- α 、IL-6和IL-1 β 水平的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Effect of Mume Fructus on TNF- α , IL-6 and IL-1 β in the serum of mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

| 组别 Group | 剂量 Does(g/kg) | TNF- α (pg/mL) | IL-6 (pg/mL) | IL-1 β (pg/mL) |
|-------------|------------------|--------------------------|-----------------|-------------------------|
| B | - | 17.89 ± 3.25 | 26.68 ± 4.20 | 6.74 ± 7.28 |
| M | - | 27.47 ± 6.99 ** | 23.76 ± 3.10 | 3.98 ± 2.69 |
| L | 0.78 | 32.08 ± 4.09 | 23.51 ± 3.13 | 3.41 ± 2.43 |
| Me | 1.56 | 20.42 ± 3.31 ## | 27.68 ± 1.78 | 6.43 ± 2.40 |
| H | 7.8 | 31.97 ± 7.60 | 26.59 ± 4.67 # | 9.56 ± 5.47 # |

注:与空白对照组比较, ** $P < 0.01$;与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with B, ** $P < 0.01$; Compared with M, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

2.3 HE 染色及组织病理观察

作为药食同源物质,乌梅长期用于日常饮食保健,其安全性已得到证实;但临床提示长期、大量服用乌梅,会引起病人胃部不适。为了研究服用乌梅对肠黏膜的影响及服用高剂量乌梅的初步安全性,将灌胃不同剂量乌梅提取物的小鼠肠黏膜及高剂量乌梅提取物的小鼠心、肝、脾、肺、肾、胃 HE 染色(见图 2),由 2 名经验丰富的病理医师阅片。结果显示,脏器几乎无病变;实验剂量的抗生素没有引起肠

粘膜的损伤,高、中、低剂量的乌梅也没有引起肠黏膜损伤,粘膜层及粘膜下层都很完整;小鼠灌胃高剂量乌梅,心、肝、肾、脾正常;胃轻度水肿,仍属正常范围;肺间质少量炎性细胞,肺泡腔扩张,肺泡壁塌陷,可见部分水肿。病理切片的结果和血清 TNF- α 上升,提示高剂量乌梅对胃有刺激,有可能引起机体慢性炎症,这与临床长期、大量服用乌梅病人胃部不适相吻合。

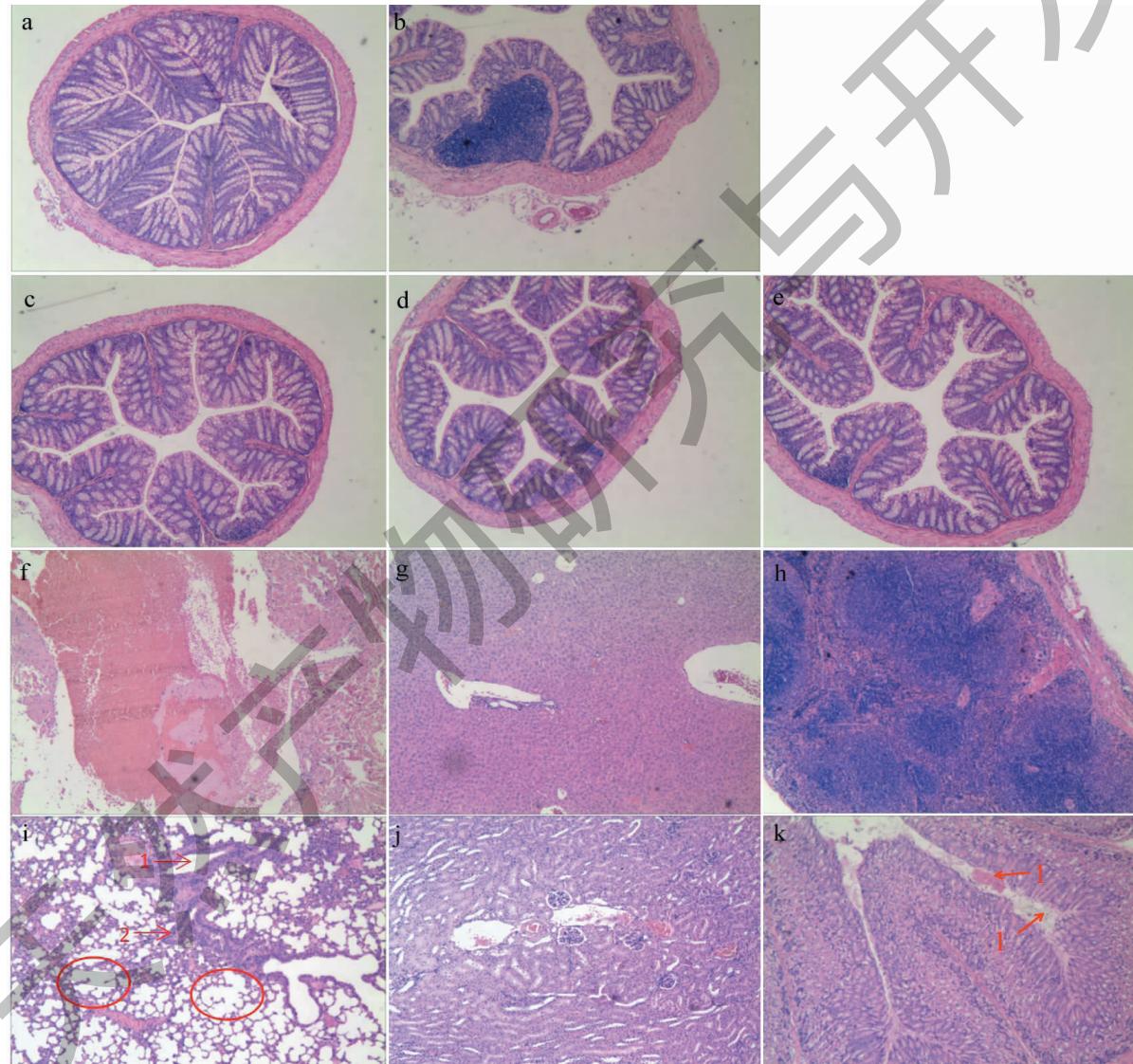


图 2 组织病理切片 HE 染色图($\times 40$)

Fig. 2 Pathological sections of tissues HE staining ($\times 40$)

注:a;B组小肠;b;M组小肠;c;L组小肠;d;Me组小肠;d;H组小肠;f;H组心;g;H组肝;h;H组脾;i;H组肺;j;H组肾;k;H组胃。红色圈为肺泡腔扩张,肺泡壁塌陷;红色箭头 1 为水肿;红色箭头 2 为炎性细胞(蓝紫色)。Note: a: The intestinal tissue of B; b: The intestinal tissue of M; c: The intestinal tissue of L; d: The intestinal tissue of Me; e: The intestinal tissue of H group; f: The heart tissue of H; g: The liver tissue of H; h: The spleen tissue of H; i: The lung tissue of H; j: The kidney tissue of H; k: The stomach tissue of H. Red circle: The expanded alveolar cavity and collapsed alveolar compartment; Red arrow 1: Edema; Red arrow 2: Inflammatory cells (blue-purple).

2.4 乌梅对抗生素诱导肠道菌群紊乱的调节作用

2.4.1 肠道菌群的多样性分析

采用 α 和 β 多样性分析,描述和评价菌群的整体结构。 α 多样性反映的是单个样品内部的物种多

样性。稀释曲线趋于平缓,可以认为测序深度已经基本覆盖到样品中所有的物种。图3显示,所有样本在测序量1 000左右时出现明显的转折点,随后进入平缓期,说明本次测序深度充分。

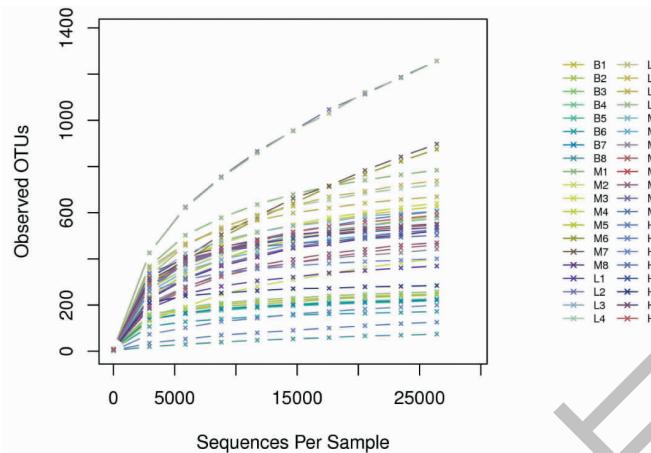


图3 小鼠肠道菌群的稀释曲线
Fig. 3 Rarefaction curves of murine gut microbiota

Ace与Chao1指数反映菌群物种的丰富度;Shannon及Simpson指数是均匀度和丰富度的综合指标。由表2可知,与空白对照组相比,模型组小鼠的肠道菌群丰富度指数(Ace和Chao1)极显著升高($P<0.01$),多样性指数(Shannon和Simpson指数)未发生明显改变;中剂量和高剂量乌梅可以逆转抗生素引起的小鼠的肠道菌群丰富度(Ace和Chao1)

的变化($P<0.05$),多样性指数(Shannon Wiener和Simpson指数)未发生明显改变。Chao1是度量物种丰富度的指标,它和丰度、均匀度无关,但是它对稀有的物种很敏感,由此可知,抗生素引起小鼠肠道菌群的紊乱,大量正常状态下不生长的菌开始定植、生长,包括大量致病菌。

表2 各组小鼠肠道菌群多样性指数($\bar{x} \pm s, n=8$)
Table 2 Intestinal microbial diversity indexes of respective groups of mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

| 组别 Group | Ace | Chao1 | Shannon | Simpson |
|----------|---------------------|---------------------|---------------|-------------|
| B | 247.70 ± 58.58 | 254.49 ± 60.68 | 4.77 ± 1.53 | 0.89 ± 0.16 |
| M | 1034.40 ± 570.41 ** | 1170.61 ± 803.02 ** | 4.68 ± 1.21 | 0.84 ± 0.17 |
| L | 1142.17 ± 812.81 | 1288.42 ± 752.21 | 5.81 ± 0.60 # | 0.94 ± 0.02 |
| Me | 609.34 ± 70.85 | 612.05 ± 70.04 | 5.20 ± 0.80 | 0.92 ± 0.06 |
| H | 465.34 ± 173.60 # | 466.10 ± 185.04 # | 4.78 ± 1.98 | 0.81 ± 0.23 |

注:与空白对照组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

Note: Compared with B, ** $P<0.01$; Compared with M, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

β 多样性反映的是不同分组样本的差异,本实验同时采用PCA分析(principal component analysis, 主成分分析)、PCoA分析(principal co-ordinates analysis, 主坐标分析)和NMDS分析(nonmetric multidimensional scaling, 非度量多维尺度分析)进行分析。PCA分析根据OTU丰度降维找主要影响因素,而PCoA和NMDS分析是基于不同算法的距离矩阵进行分析。结果显示,模型组和空白对照组小鼠菌

群结构差异明显,不同剂量乌梅可以回调(图4A、B、C)。

2.4.2 肠道菌群的结构分析

肠道微生物群落结构直方图(图5)揭示了微生物种类及其相对丰度。在门水平上,空白对照组厚壁菌门和拟杆菌门是最主要的物种,丰度比例达到90%以上,其中厚壁菌门和拟杆菌门的相对丰度比例分别为41.87%和56.69%。抗生素显著升高小

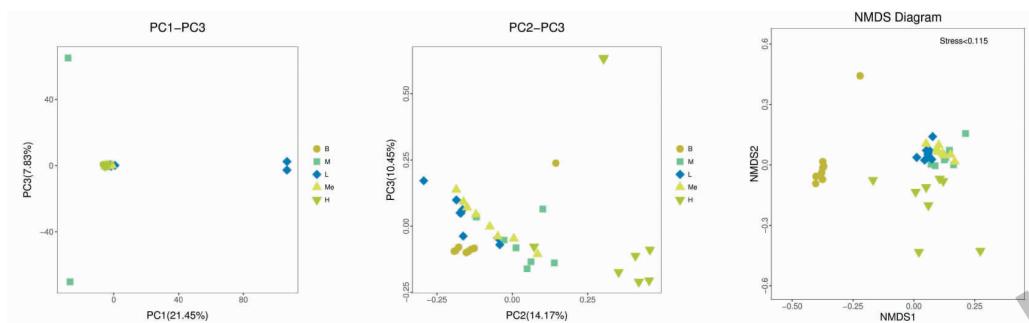


图4 小鼠肠道菌群主成分(A)、主坐标(B)和非度量多维尺度分析(C)

Fig. 4 4 PCA (A), PCoA (B) and NMDS (C) analysis of murine gut microbiota

鼠肠道变形菌门($P < 0.001$)和放线菌门($P < 0.01$)的相对丰度,而拟杆菌门($P < 0.01$)丰度及拟杆菌门/厚壁菌门的比例显著降低。

在属水平上,与空白对照组相比,抗生素显著增加了 *Clostridium sensu stricto* _1 ($P = 0.003$) *Halomonas* ($P = 0.011$)、*Weissella* ($P = 0.001$)、*Streptococcus* ($P = 0.000$)、*Staphylococcus* ($P = 0.001$)、*Enterococcus* ($P = 0.002$)、*Curtobacterium* ($P = 0.001$)、*Enhydrobacter* ($P = 0.035$)、*Collinsella* ($P = 0.019$)、*Bradyrhizobium* ($P = 0.020$)、*Enterobacter* ($P = 0.035$) 的相对丰度,显著降低 *Lactobacillus* ($P = 0.037$)、*Faecalibaculum* ($P = 0.041$)、*Bifidobacterium* ($P = 0.001$)、*Desulfovibrio* ($P = 0.001$)、*Roseburia* ($P = 0.001$)、*Alloprevotella* ($P = 0.001$)、*Ruminiclostridium* _9 ($P = 0.015$)、*Ruminococcaceae* _UCG-014 ($P = 0.003$)、*Parabacteroides* ($P = 0.033$)、*Parasutterella* ($P = 0.015$)、*Lachnoclostridium* ($P = 0.005$)、*Akkermansia* ($P = 0.015$)、*Marvinbryantia* ($P = 0.025$)、*Ruminococcaceae* _UCG-005 ($P = 0.043$)。而乌梅可以改善抗生素引起的菌群紊乱的状况。在门水平上,中、低剂量的乌梅显著降低变形菌门的相对丰度。在属水平上,中、低剂量的乌梅显著上调 *Lactobacillus* ($P = 0.001, P = 0.000$) 和 *Faecalibaculum* ($P = 0.005, P = 0.038$),高、低剂量的乌梅显著上调 *Bifidobacterium* ($P = 0.000, P = 0.000$) 和 *Blautia* ($P = 0.049, P = 0.000$) 的相对丰度。

A

B

图5 乌梅对门(A)和属(B)水平小鼠肠道菌群结构的影响

Fig. 5 The effects of MF on the relative abundance of murine gut microbiota at phylum (A) and genus (B) level

2.4.3 肠道菌群的差异性分析

为了确定各组之间具有显著差异的细菌类群,在组间进行了 LEfSe (linear discriminate analysis size

effect) 分析(图 6),寻找组间在丰度上有显著差异的物种。LDA 值分布柱状图中展示了组间具有统计学差异的 Biomarker。结果显示,LDA score 大于 4

的分类群:空白对照组12个,分别为拟杆菌纲、拟杆菌目、拟杆菌门、毛螺杆菌科、拟杆菌属、乳杆菌目、乳杆菌科等;模型组7个,分别为立克次氏体目、生氧光细菌纲、蓝细菌门、梭菌科、梭菌属等;低剂量乌梅组7个,分别为厚壁菌门、梭菌纲、梭菌目、消化链

球菌科等;中剂量乌梅组1个,芽孢杆菌目;高剂量组8个,分别为变形杆菌门、 α -变形杆菌纲、根瘤菌目、根瘤菌科、柄杆菌目、柄杆菌科、 β -变形杆菌纲、 γ -变形杆菌纲。

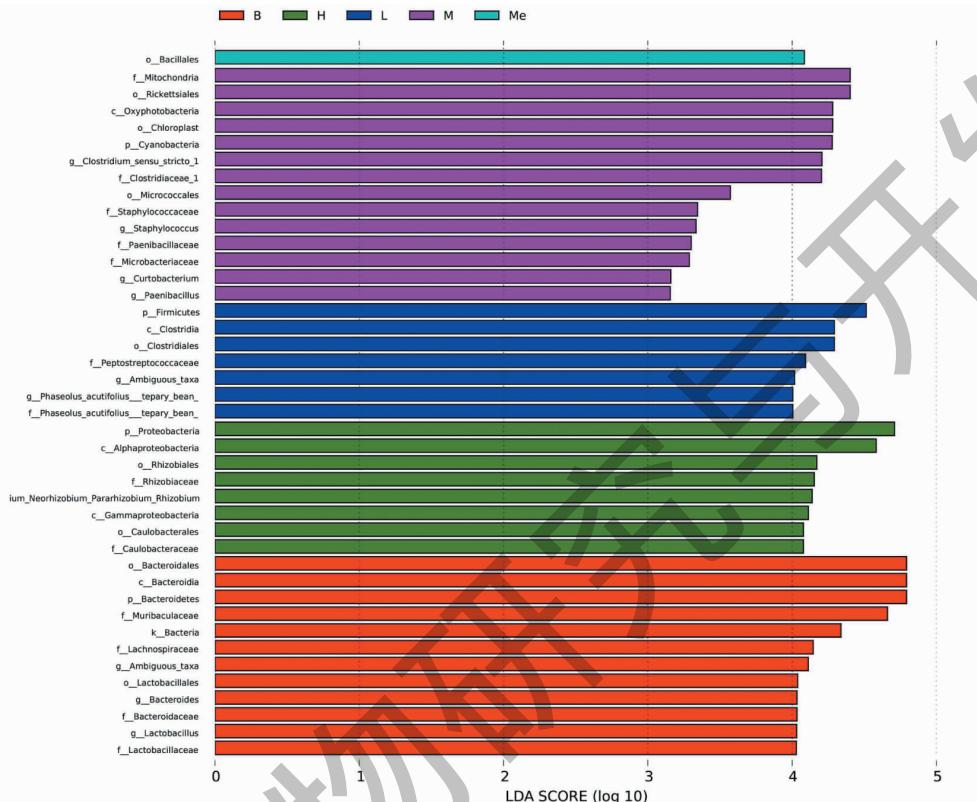


图6 不同样品肠道菌群的 LEfSe 分析图

Fig. 6 LEfSe analysis of gut microbiota community for all samples

2.4.4 PICRUSt 功能预测分析

PICRUSt 功能预测分析基于 Greengenes 数据库注释的 16S 测序数据。肠道菌群预测准确度较高,可以达到 85%-90% 以上。

通过对 KEGG 数据库 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 进行比对,共获得 7 类生物代谢通路功能分析(一级功能层):人类疾病(human diseases)、代谢(metabolism)、遗传信息处理(genetic information processing)、有机系统(organismal systems)、细胞过程(cellular processes)和环境信息处理(environmental information processing)。模型组的预测基因拷贝数在人类疾病、遗传信息处理、有机系统和环境信息处理 4 个一级功能层,较空白对照组增高,预测基因拷贝数相应增加;而代谢、未分类、未知这 3 个一级功能层,较空白对照组减少。中、低剂

量的乌梅可以逆转这些过程。进一步对预测基因二级功能层进行分析,发现其由细胞过程和信号(cellular processes and signaling)、遗传信息处理(genetic information processing)、癌症(cancers)、内分泌系统(endocrine system)、次生产物代谢的生物合成(biosynthesis of other secondary metabolites)、转录(transcription)、细胞生长和死亡(cell growth and death)等 30 个子功能组成(图 5)。对基因拷贝数进行分析,发现低、中剂量乌梅组可以逆转抗生素引起的癌症(cancers)、感染性疾病(infectious diseases)、神经退行性疾病(neurodegenerative diseases)和能量代谢 4 个子功能预测基因拷贝数的显著升高。

3 讨论

乌梅药食历史悠久,集医疗、保健、养生于一体。《本草从新》记载其可涩肠敛肺,止血涌痰,消肿解

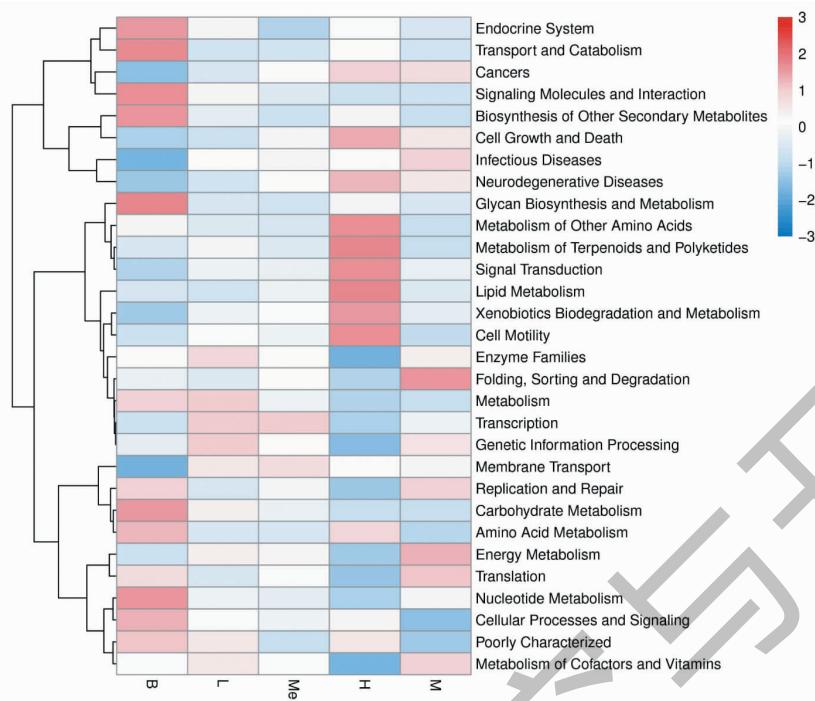


图 7 不同样品功能预测热图(二级功能层)

Fig. 7 Heatmap of gut miocrobial function prediction for all samples (hierarchy level 2)

毒,生津止渴,治久嗽泻痢,血痢尤良。临床专家辨证灵活化裁运用含乌梅的方剂,治疗肺系疾病如哮喘、过敏性鼻炎,胃肠疾病如慢性胃炎、顽固性腹泻、炎症性肠病、肠道恶性肿瘤,神经系统疾病如头痛、眩晕、失眠、帕金森病,以及代谢性疾病如糖尿病等^[3-7]。作为药食同源中药,乌梅兼具营养与“扶正”作用,安全性高,日常饭食、茶饮、酒水中都有乌梅的身影。

肠道微生态与中医学都强调平衡,一旦失调,则需“扶正”使之恢复平衡。本研究以临床常联用的广谱抗生素—硫酸庆大霉素和头孢噻肟钠灌胃造成小鼠肠道菌群失调模型(造模剂量约为人临床最大用量的10倍)^[8],研究乌梅对菌群失调的调节作用,探讨其作为微生态调节剂应用于临床和养生保健的机制。通过对肠道菌群的结构分析和对炎症因子的检测,发现乌梅可改善抗生素引起的菌群紊乱的状况,并且调节炎性因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6至正常水平。

健康人肠道通常缺氧,菌群以厌氧菌为主,致病性的兼性厌氧菌被压制;许多疾病状态下,兼性厌氧菌大量繁殖,标志着肠道菌群失调。代谢紊乱、免疫失调期间,宿主对肠道生态系统的控制受损,兼性厌氧菌群转变为优势菌群,以变形菌门(含有许多条

件致病菌)的增多为标志;有学者提出以变形菌门扩增作为肠道上皮功能障碍的诊断特征,和非传染性疾病(如肥胖、哮喘等)的潜在生物标志物^[9]。2型糖尿病、炎症性肠病(IBD)、精神疾病患者及多种呼吸道疾病中,均观察到变形菌门高表达^[10-12]。模型组小鼠变形菌门的相对丰度显著升高,中、低剂量的乌梅显著降低变形菌门的相对丰度,这与乌梅涩肠敛肺,生津止渴的功效相一致。

研究发现无菌小鼠肠道内定殖的罗伊氏乳杆菌、卷曲乳杆菌等通过粒细胞-巨噬细胞集落(GM-CSF)刺激特定的免疫功能,从而抵御肺部感染^[13]。动物双歧杆菌通过几种特定的代谢分子介导无菌小鼠抗流感作用,或许能用于预防流感和作为流感预后的标志物^[14]。小鼠肠道乳杆菌和双歧杆菌的丰度被证实与疟疾感染的严重程度相关,具有调节肠道菌群降低感染的潜在价值^[15]。DSS诱导的IBD小鼠移植乳杆菌属细菌,可逆转DSS造成的结肠缩短,减轻炎症、增加结肠干细胞数量^[16]。一项纳入17名肥胖个体、22名肥胖且伴随2型糖尿病患者,及27名健康个体的研究提示双歧杆菌属细菌可能成为2型糖尿病和肥胖疾病发生发展的生物标志物^[17]。一项纳入1 001名20~76岁日本受试者的横断面研究显示,Blautia(布劳特氏菌属)与内脏脂

肪面积(VFA)呈显著负相关^[18]。肥胖及肥胖+胰岛素抵抗儿童的粪便中 *Blautia* 菌属显著减少,而炎症因子却升高,体外单核细胞培养物中, *Blautia* 属的特定物种表现出抗炎作用^[19]。一项纳入 103 名马来西亚成年人的随机双盲安慰剂对照试验显示,补充植物乳杆菌 P8 可显著缓解压力、焦虑,并降低血浆中的炎症因子,提升记忆及认知能力^[20]。而在结直肠癌小鼠模型的研究发现, *Faecalibaculum rodentium* 可通过产生短链脂肪酸发挥抗肿瘤作用^[21]。

本研究显示,中、低剂量的乌梅在属水平上,显著上调 *Lactobacillus* 和 *Faecalibaculum*,高、低剂量的乌梅显著上调 *Bifidobacterium* 和 *Blautia* 的相对丰度。据此,我们推测乌梅介导 *Lactobacillus*、*Bifidobacterium*、*Blautia* 和 *Faecalibaculum* 等益生菌,通过肺-肠轴、肠-脑轴发挥对肺系疾病、胃肠道炎症和肿瘤,以及代谢疾病和神经系统疾病的防治作用,这也与 PICRUSt 的预测结果相符合。

本研究通过检测炎性因子研究乌梅对慢性炎症的改善作用。TNF- α 启动炎症过程,诱导调节继发性细胞因子的产生,不仅在感染与炎症反应中起核心作用,其功能还涉及肿瘤细胞的生长、抑制和组织损伤等;模型组小鼠血清的 TNF- α 极显著上升,恰好与 PICRUSt 功能预测相吻合—抗生素引起模型小鼠癌症、感染性疾病、神经退行性疾病等子功能的基因拷贝数显著升高。血浆中的 TNF- α 受内脏的脂肪含量影响,而抗生素引起小鼠体重显著上升可能是小鼠 TNF- α 显著上调的诱因之一。IL-6 和 IL-1 β 由 TNF- α 诱导产生,介导炎性反应急性期,模型组小鼠 IL-1 β 、IL-6 虽下降,但不具有统计学意义,病理切片亦显示本实验中抗生素并未引起小鼠肠黏膜损伤,说明本实验中抗生素引起炎症程度较轻。对基因拷贝数进行分析,发现低、中剂量乌梅可以逆转抗生素引起的癌症、感染性疾病、神经退行性疾病和能量代谢 4 个子功能预测基因拷贝数的显著升高。但是低剂量乌梅对炎性因子的改善作用并不明显,仅中剂量乌梅调节 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 至正常水平,并有减重的效果。乌梅有抗菌的作用,炎性因子的检测结果亦支持乌梅通过干扰致病菌在肠道定植抑制其生长,上调益生菌发挥抗炎作用。高剂量乌梅组病理切片显示肺和胃组织有轻度水肿,小鼠血清 TNF- α 水平亦较高,可能因为乌梅富含有机酸,剂量过大对胃有刺激性,引起机体慢性炎症,提醒我们乌

梅虽为药食同源物质,大剂量食用也有危害。

综上所述,本研究从肠道微生态的视角探索乌梅发挥药食功效的作用机制,为乌梅的临床应用提供科学依据,并揭示其作为肠道微生态调节剂产品前景,为进一步的研究开发奠定理论基础。

参考文献

- Zhang HY, Li Q, Fu XL. Research progress on chemical components and pharmacological effects of Wumei (Mume Fructus) [J]. Shanghai J Tradit Chin Med(上海中医药杂志), 2017, 51(Suppl 1): 296-300.
- Kang S, Yin ZQ, Jia RY, et al. Optimization of extraction processes of three traditional Chinese medicines with antibacterial activity [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2014, 26: 2014-2021.
- Cui HS, Yao HQ, Wang J, et al. Clinical experience of TCM master WANG Qi in the treatment of allergic asthma based on three-dimensional differentiation of constitution-disease-syndrome [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2018, 33: 130-132.
- Liu SL. Prevention and treatment of colorectal adenoma based on combination of disease-syndrome [J]. Jiangsu J Tradit Chin Med(江苏中医药), 2018, 50(9): 1-4.
- Wang S, Xu X, Zhang MZ, et al. Professor Jiang-shiqing's experience to treat carcinoma of large intestine by the differentiation of symptom based on reversal yin from six-meridian [J]. Acta Chin Med(中医学报), 2016, 31: 467-469.
- Ding XJ, Dong ZP, Sun XL. To explore the clinical application of dark plum from compatibility regularity of prescriptions containing dark plum in Chinese patent formulae [J]. Liaoning J Tradit Chin Med(辽宁中医杂志) 2017, 44: 2529-2532.
- Litvak Y, Byndloss MX, Tsolis RM, et al. Dysbiotic Proteobacteria expansion:a microbial signature of epithelial dysfunction [J]. Curr Opin Microbiol, 2017, 39: 1-6.
- Li M, Wu X, Cao Y. Impact of antibiotics on the murine gut microbiota determined by high-throughput sequencing [J]. Chin J Microecol(中国微生态学杂志), 2019, 31: 993-999.
- Byndloss MX, Bäumler AJ. The germ-organ theory of non-communicable diseases [J]. Nat Rev Microbiol, 2018, 16: 103-110.
- Shen Y, Xu JT, Li ZY, et al. Analysis of gut microbiota diversity and auxiliary diagnosis as a biomarker in patients with schizophrenia: a cross-sectional study [J]. Schizophr Res, 2018, 197: 470-477.
- Sverrild A, Kiilerich P, Brejnrod A, et al. Eosinophilic airway

- inflammation in asthma is associated with an altered airway microbiome [J]. *J Allergy Clin Immun*, 2017, 140:407-427.
- 12 Thomann AK, et al. Review article: bugs, inflammation and mood—a microbiota-based approach to psychiatric symptoms in inflammatory bowel diseases [J]. *Aliment Pharm Ther*, 2020, 52:247-266.
- 13 Brown RL, Sequeira RP, Clarke TB. The microbiota protects against respiratory infection via GM-CSF signaling [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1):1512.
- 14 Zhang Q, Hu J, Feng JW, et al. Influenza infection elicits an expansion of gut population of endogenous *Bifidobacterium animalis* which protects mice against infection [J]. *Genome Biol*, 2020, 21(1):99.
- 15 Villarino NF, Lecler GR, Denny JE, et al. Composition of the gut microbiota modulates the severity of malaria [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113:2235-2240.
- 16 Rangan P, Choi I, Wei M, et al. Fasting-mimicking diet modulates microbiota and promotes intestinal regeneration to reduce inflammatory bowel disease pathology [J]. *Cell Rep*, 2016, 2704-2719.
- 17 Agnieszka S, Agata M, Małgorzata B, et al. Metagenomic analysis of duodenal microbiota reveals a potential biomarker of dysbiosis in the course of obesity and type 2 diabetes: a pilot study [J]. *J Clin Med*, 2020, 9(2):369.
- 18 Ozato N, Saito S, Yamaguchi T, et al. *Blautia* genus associated with visceral fat accumulation in adults 20-76 years of age [J]. *NPJ Biofilms Microbi*, 2019, 5:28.
- 19 Benítez-Páez A, Pugar EMGD, López-Almela I, et al. Depletion of *Blautia* species in the microbiota of obese children relates to intestinal inflammation and metabolic phenotype worsening [J]. *mSystems*, 2020, 5(2):e00857.
- 20 Lew LC, Hor Y, Yusoff NA, et al. Probiotic *Lactobacillus plantarum* P8 alleviated stress and anxiety while enhancing memory and cognition in stressed adults; a randomised, double-blind, placebo-controlled study [J]. *Clin Nutr*, 2018, 38: 2053-2064.
- 21 Zagato E, Pozzi C, Bertocchi A, et al. Endogenous murine microbiota member *Faecalibaculum rodentium* and its human homologue protect from intestinal tumour growth [J]. *Nat Microbiol*, 2020, 5:511-524.

研究设计益生菌生产 β -胡萝卜素

2021 年 4 月 12 日 ACS Synthetic Biology 报道, 北卡罗来纳州立大学研究者对一种益生菌酵母进行了基因改造, 使其在无菌小鼠肠道中产生 β -胡萝卜素。该研究提供了一套利用基因工具来修饰益生菌酵母进行生产的全部流程。

布拉酵母菌 (*Saccharomyces boulardii*) 是一种益生菌酵母, 可以耐受胃酸, 并且可以在哺乳动物肠道中存活和繁殖, 并且抑制有害细菌引起肠道感染。该益生菌还易于转化, 可以在肠道中产生溶菌酶、IL-10 等治疗性蛋白质。

研究者验证了两种广泛使用的 CRISPR 系统和专用于酿酒酵母数十种基因修饰工具的在布拉酵母菌中的适用性, 说明该益生菌是一种有潜力的生物制造菌种。研究者首先对布拉酵母菌的工程基因表达进行了迄今为止最全面的分析, 在基于质粒和基因组的背景下, 对布拉酵母菌遗传部件(启动子、选择性标记、复制起源和终止子)的特征库进行了描述。然后, 研究者应用这些部件首次构建了具有高水平的维生素前体(β -胡萝卜素)和药物(violacein)生产的布拉酵母菌株系。对比研究发现布拉酵母可以在无菌小鼠中稳定定居超过 30 天, 并与共生微生物竞争利基空间, 在正常或者抗生素处理的小鼠中肠道停留时间短(1~2 天)。最后, 研究者在 14 天的时间内在无菌小鼠肠道中合成 β -胡萝卜素(194 μ g)。

该研究是首次在菌株中证明了异源小分子的原位生产, 这项工作确立了在哺乳动物肠道内设计布拉酵母菌以生产小分子药物的能力, 并提供了一套可以调节滴度的工具。

吴晓燕编译自:<https://phys.org/news/2021-04-probiotic-yeast-beta-carotene.html>

原文链接:<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acssynbio.0c00562>

原文标题: In Situ Biomanufacturing of Small Molecules in the Mammalian Gut by Probiotic *Saccharomyces boulardii*