

锦灯笼提取物对抗菌药物致小鼠肠道菌群失调的预防作用

王春阳*, 王晓欣, 曹雪姣, 辛毅, 李新莉[#](大连医科大学生物技术系, 辽宁大连 116044)

中图分类号 R285.5;R57 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)35-3282-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.35.06

摘要 目的:研究锦灯笼提取物对抗菌药物致小鼠肠道菌群失调的预防作用。方法:48只BALB/c小鼠随机均分为正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、丽珠肠乐(2 mg/kg)组与锦灯笼提取物高、中、低剂量(80、40、20 mg/kg)组,灌胃给药,每天1次,连续7 d。末次给药后第2天灌胃盐酸左氧氟沙星(1.3 mg/kg),每天1次,连续7 d以致小鼠肠道菌群失调。收集小鼠粪便,提取基因组DNA,采用聚合酶链反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)法获得肠道菌群指纹图谱,进行相似性及优势条带的序列分析。结果:灌胃抗菌药物前,小鼠肠道优势菌型为内普雷沃氏菌和乳酸杆菌,高、中、低剂量锦灯笼提取物可增加其乳酸杆菌数量;灌胃抗菌药物后,高、中、低剂量锦灯笼提取物可促进模型小鼠肠道内拟杆菌的生长,使其成为优势菌型。结论:锦灯笼提取物能增加肠道乳酸杆菌的数量,对抗菌药物致小鼠肠道菌群失调有预防作用。

关键词 锦灯笼;聚合酶链反应-变性梯度凝胶电泳;肠道菌群

Prevention Effects of *Physalis alkekengi* Extract against Antibiotic-induced Intestinal Microflora Imbalance of Mice

WANG Chun-yang, WANG Xiao-xin, CAO Xue-jiao, XIN Yi, LI Xin-li (Dept. of Biotechnology, Dalian Medical University, Liaoning Dalian 116044, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the prevention effect of *Physalis alkekengi* extracts against antibiotic-induced intestinal microflora imbalance of mice. METHODS: Mice were given levofloxacin hydrochloride intragastrically on the second day after last medication, once a day, for consecutive 7 days. 48 BALB/c mice were randomly divided into normal control group, model group, Lizhu changle group (2 mg/kg) and *P. alkekengi* high-dose, medium-dose and medium-dose groups (80, 40, 20 mg/kg); they were given relevant medicine intragastrically once a day for consecutive 7 days. Then the feces of mice were collected. After extraction of bacterial genomic DNA from feces, the fingerprint of intestinal microflora was determined by PCR-DGGE, and the similarity and the sequence analysis of the dominant bands were carried out. RESULTS: Before intragastric administration of antibiotics, *Prevotella* and *Lactobacillus* were dominant organisms; the number of *Bacillus acidi lactici* was increased by high-dose, medium-dose and low-dose *P. alkekengi* extract. After intragastric administration of antibiotics, high-dose, medium-dose and low-dose *P. alkekengi* extract could promote the generation of bacteroid which became dominant organism. CONCLUSIONS: *P. alkekengi* extract increase the number of *Bacillus acidi lactici*, and prevent antibiotic-induced intestinal microflora imbalance.

KEYWORDS *Physalis alkekengi*; PCR-DGGE; Intestinal microbiota

抗菌药物是临床治疗感染性疾病的主要药物,长期大量使用会导致肠道菌群失调^[1],引起二重感染^[2],如何合理选择抗生素成为大家面临的重要问题。本课题组前期研究^[3]表明,中药锦灯笼^[4]能促进乳酸杆菌的体外生长,对大肠杆菌有抑制作用。为进一步研究其在体内对肠道细菌的作用,本课题组首次将聚合酶链反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术^[5]应用到锦灯笼预防肠道菌群失调的研究中。PCR-DGGE可以将相同长度但序列不同的DNA片段分离,每一条带与肠道优势菌群相对应,条带越多说明菌群多样性越丰富,染色后条带的强度越强说明该细菌的数量越多,从而反映肠道菌群的种类和数量^[6]。获得肠道菌群指纹图谱,分析相似性,鉴定优势条带的序列,从“未病防病”的中医学角度来研究肠道微生态,为进一步寻找新型微生态制剂以恢复正常菌群结构、保护肠黏

膜屏障、减少细菌易位和移植感染的发生提供了一个新的思路。

1 材料

1.1 仪器

UVS-1型涡旋振荡器(北京优晟联合科技有限公司); HC-3018R型高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学有限公司); JY-SPAT型琼脂糖水平电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司);Mycycler PCR扩增仪、D-Code™ DGGE电泳仪(美国Bio-Rad公司);RE-52A型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 药材

锦灯笼由笔者鉴定为真品。

1.3 药品与试剂

盐酸左氧氟沙星胶囊(海口奇力制药股份有限公司,批号:20115533,规格:0.2 g/粒);丽珠肠乐胶囊(丽珠集团丽珠制药厂,批号:S10960040,规格:每粒0.35g)。E.Z.N.A®粪便DNA提取试剂盒(美国OMEGA公司);Ex TaqDNA聚合酶(大连宝生物工程有限公司);琼脂糖凝胶(上海易拓科技开发有

* 本科生。研究方向:中药与肠道微生态。E-mail: 853699099@qq.com

[#] 通信作者:讲师。研究方向:中药与肠道微生态。E-mail: lixinlibio@163.com

限公司);丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、尿素(上海双螺旋生物科技有限公司);去离子甲酰胺(上海艾研生物科技有限公司);引物由大连宝生物工程有限公司合成。

1.4 动物

SPF级BALB/c小鼠,♀♂兼半,体质量18~22g,由大连医科大学实验动物中心提供[实验动物使用许可证:SCXK(辽)2008-0002]。

2 方法

2.1 复制模型与分组、给药

锦灯笼100g,热水回流提取2次,每次2h,合并滤液,蒸发浓缩得锦灯笼提取物。48只BALB/c小鼠随机均分为6组,即正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、丽珠肠乐(2mg/kg)组与锦灯笼提取物高、中、低剂量(80、40、20mg/kg)组^[7]。ig给药,每天1次,连续7d。末次给药后开始ig盐酸左氧氟沙星(1.3mg/kg),每天1次,连续7d,以复制小鼠肠道菌群失调模型^[8]。

2.2 PCR-DGGE法测定粪便细菌基因组DNA表达

2.2.1 粪便的收集 收取小鼠粪便,于-80℃贮藏,备用。采用E.Z.N.A[®]粪便DNA提取试剂盒抽提粪便细菌基因组DNA,于-20℃贮藏,备用。

2.2.2 PCR扩增 细菌微生物区系的变化使用16S rRNA基因V3可变区作为靶标进行扩增。根据参考序列^[9]设计上游引物GC-341f和下游引物518r。扩增体系(25μl)为:10×缓冲液(含Mg²⁺)2.5μl,dNTP混合物4μl,牛血清白蛋白(1mg/ml)2.5μl,20μmol/L的上、下游引物各0.5μl,5U/μl Ex TaqDNA聚合酶0.25μl,DNA模板3μl,去离子无菌水补充体系至25μl。PCR反应条件:94℃预变性5min;94℃变性30s,54℃退火30s,72℃延伸30s,共30个循环;72℃延伸7min,4℃贮藏。

2.2.3 DGGE (1)相似性和多样性分析:对16S rRNA基因V3可变区的扩增产物进行DGGE分析。DGGE采用8%丙烯酰胺凝胶,30%~60%[100%变性梯度包含40%(V/V)去离子甲酰胺和7mol/L尿素]变性梯度。电泳温度为60℃,以200V电压预电泳10min,70V电压电泳4h。电泳完成后进行硝酸银染色,采用Quantity One 4.6.2软件进行相似性和多样性分析。(2)优势条带的序列分析:切下DGGE图谱中清晰且亮度高的优势条带,加入20μl无菌水、捣碎,4℃过夜、90℃浸泡10min,取上清液做模板进行PCR扩增,PCR反应体系和条件同“2.2.3(1)”项下。所得序列在GenBank数据库中进行Blast对比分析。

3 结果

3.1 DGGE图谱

ig抗菌药物前,各组小鼠肠道菌群在种类和数量上差异不大。N泳道大量条带的存在,表明正常肠道内存在大量细菌;B泳道和L、M、H泳道仍有大量条带存在,只是条带的亮度较N泳道有所改变,表明ig丽珠肠乐和锦灯笼提取物之后,肠道细菌在种类上改变不大,仅某些优势菌的含量发生了变化。条带a、b、c存在于各组样品中,为共有条带,说明这些条带所代表的细菌是肠道优势菌群。ig抗菌药物7d后,N'泳道的条带在数量和亮度上明显降低,表明正常小鼠肠道菌群发生明显改变,长时间ig抗菌药物能杀灭肠道中大部分细菌;B'泳道

和L'、M'、H'泳道的条带数量也有所减少,但条带d亮度增强,且在B'泳道中亮度最强,表明该条带所代表的细菌可能是被丽珠肠乐和锦灯笼提取物促生的优势菌。DGGE图谱见图1。

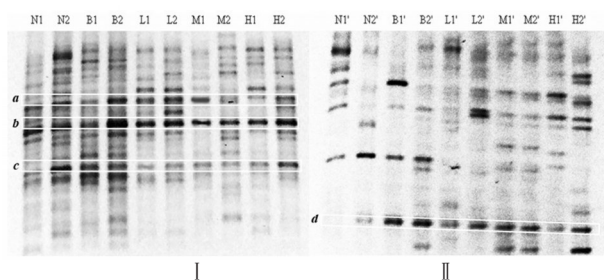


图1 DGGE图谱

I.ig抗菌药物前;N.模型组;B.丽珠肠乐组;L.锦灯笼提取物低剂量组;M.锦灯笼提取物中剂量组;H.锦灯笼提取物高剂量组;II.ig抗菌药物后;N'.模型组;B'.丽珠肠乐组;L'.锦灯笼提取物低剂量组;M'.锦灯笼提取物中剂量组;H'.锦灯笼提取物高剂量组

Fig 1 DGGE profile

I .before intragastric administration of antibiotics; N.model group; B.Lizhu changle group; L. *P. alkekengi* low-dose group; M. *P. alkekengi* medium-dose group; H. *P. alkekengi* high-dose group; II .after intragastric administration of antibiotics; N' .model group; B' .Lizhu changle group; L' .*P. alkekengi* low-dose group; M' . *P. alkekengi* medium-dose group; H' . *P. alkekengi* high-dose group

3.2 DGGE图谱相似性分析

采用Quantity One 4.6.2分析软件分别对DGGE结果进行平均数非权重配对法(UPGMA)相似性聚类分析。抗菌药物使用前,各组间相似性较高,正常对照组与锦灯笼提取物中、低剂量组聚成一簇,丽珠肠乐组、锦灯笼提取物高剂量组各自聚成一簇。ig抗菌药物后,正常对照组与其他组之间的相似性仅40%,丽珠肠乐组与锦灯笼提取物高、中剂量组相似性较高,聚成一簇。UPGMA图谱相似性聚类分析见图2。

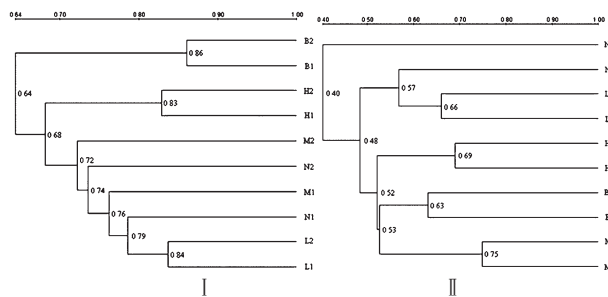


图2 UPGMA相似性聚类分析

I.ig抗菌药物前;II.ig抗菌药物后;N.模型组;B.丽珠肠乐组;L.锦灯笼提取物低剂量组;M.锦灯笼提取物中剂量组;H.锦灯笼提取物高剂量组

Fig 2 Cluster analysis of UPGMA similarity

I .before intragastric administration of antibiotics; II .after intragastric administration of antibiotics; N.model group; B.Lizhu changle group; L. *P. alkekengi* low-dose group; M. *P. alkekengi* medium-dose group; H. *P. alkekengi* high-dose group

3.3 DGGE图谱中主要优势条带的序列分析

通过对DGGE图谱中的主要优势条带进行序列分析发现,粪便中的细菌与数据库中的已知细菌序列有很高的相似性,均在96%以上。DGGE图谱中主要优势条带的序列分析

见表1。

表1 DGGE图谱中主要优势条带的序列分析

Tab 1 The sequence of DGGE dominant bands

条带编号	相似序列细菌编号及名称	相似度, %
a	ADFQ01000002.1 普雷沃氏菌(<i>Prevotella amnii</i>)	97
b	AFQJ01000002.1 约氏乳酸杆菌(<i>Lactobacillus johnsonii</i>)	97
c	ADFT01000001.1 加氏乳酸杆菌(<i>Lactobacillus gasseri</i>)	100
d	ACTC01000133.1 拟杆菌(<i>Bacteroides sp.</i>)	96

由表1可知,菌a与普雷沃氏菌的相似性为97%,菌b与约氏乳酸杆菌的相似性为97%,菌c与加氏乳酸杆菌的相似性为100%,菌d与拟杆菌的相似性为96%。ig抗菌药物前,小鼠的粪便标本中普雷沃氏菌和乳酸杆菌是优势菌型,ig丽珠肠乐使肠道乳酸杆菌数量明显增加,锦灯笼提取物也具有同样的作用,且随着给药剂量的增大,乳酸杆菌的数量呈现增加趋势。ig抗菌药物后,正常小鼠肠道细菌数量明显减少,抗菌药物能够杀灭肠道中的大部分细菌,导致肠道菌群失调;丽珠肠乐和锦灯笼提取物可促进拟杆菌的生长,使其成为优势菌型。

4 讨论

乳酸杆菌黏附于肠上皮细胞表面,是人体肠道中正常的优势菌群,在维持人体肠道微生态平衡、增强机体免疫力、降解有毒物质、激活免疫应答等方面发挥着重要作用^[10],且能够促进宿主的消化、吸收和肠胃功能^[11]。大量文献^[12-13]表明,中药提取物能够促进肠道正常有益菌群的生长,可维护机体微生态平衡。拟杆菌在帮助宿主分解多糖、提高营养利用率、加快肠黏膜的血管形成、维持肠道微生态平衡等方面均有重要作用^[14]。本研究中,ig丽珠肠乐和锦灯笼提取物进行预防给药,能够增加肠道益生菌——乳酸杆菌的数量,促进拟杆菌的生长,保护肠道菌群,有效减弱抗菌药物对肠道菌群的影响。

综上,锦灯笼提取物体内能够促进乳酸杆菌的生长,为微生态制剂的开发及中药合理使用提供了理论依据。这类中药微生态制剂若与抗菌药物合用,会减弱药物对益生菌的抑制和灭活作用,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,将有可能在一定程度上解决抗生素带来的不良反应^[15],并在防病治病、调节机体免疫功能、平衡肠道微生态等方面发挥一定的作用。

参考文献

[1] 劳文艳,邱红.双歧杆菌微生态制剂调节作用的应用[J].中国微生物学杂志,2002,14(5):310.
 [2] Pultz NJ, Stiefel U, Ghannoum M, et al. Effect of parenteral antibiotic administration on establishment of intestinal colonization by *Candida glabrata* in adult mice[J]. *Anti-*

microb Agents Chemother, 2005, 49(1):438.
 [3] Li XL, Zhang CL, Wu DC, et al. In vitro effects on intestinal bacterium of physalins from *Physalis alkekengi* var. *francheti*[J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(8):1460.
 [4] 李兆春,陈重,李笑然,等.锦灯笼根和茎化学成分研究[J].中草药,2012,43(10):1910.
 [5] McAuliffe L, Lawes J, Bell S, et al. The detection of *Mycoplasma* (formerly *Eperythrozoon*) *wenyonii* by 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *Vet Microbiol*, 2006, 117(2/3/4):292.
 [6] Muyzer G, Dewaal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(3):695.
 [7] 陈奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1993:31.
 [8] Li XL, Wu DC, Zhang CL, et al. Effects of levofloxacin hydrochloride on the intestinal microbiota of BALB/c mice by PCR-DGGE[J]. *Afr J Microbiol Res*, 2012, 6(14):3455.
 [9] 卢珊,孙晖,熊衍文,等.婴幼儿腹泻粪便标本菌群的16S rDNA PCR-DGGE分析[J].中国人兽患病学报,2009,25(3):225.
 [10] 李平兰,时向东,吕燕妮,等.常见中草药对两种肠道有益菌体外生长的影响[J].中国农业大学学报,2003,8(5):33.
 [11] 田碧文,庞雪云,孙蕾.中药复方制剂对肠道正常菌群体外生长的影响[J].中医导报,2005,11(9):60.
 [12] 丁轲,倪学勤,潘康生,等.中草药和乳酸杆菌合生元的研究[J].中国家禽,2003,25(1):12.
 [13] 王成涛,籍保平,朱桂华,等.五味中草药对乳酸菌生长及保存活力的影响[J].中国微生物学杂志,2004,16(2):75.
 [14] Hooper LV, Wong MH, Thelin A, et al. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine[J]. *Science*, 2001, 291(5505):881.
 [15] 李新莉,吴大畅,张翠丽,等.盐酸林可霉素和头孢拉定对BALB/c小鼠肠道菌群影响的比较[J].中国药房,2012,23(33):3089.

(收稿日期:2014-01-20 修回日期:2014-03-05)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊,欢迎投稿、订阅