

百合多糖的纯化及其对肠道菌群失调小鼠的调节作用

赵芷萌, 赵 宏, 王宇亮, 沈 宇, 王朝兴, 孟繁玲, 张 曼, 张 宇*

(佳木斯大学药学院, 黑龙江省新药创制与药效毒理学评价重点实验室, 黑龙江佳木斯 154007)

摘 要:对百合多糖进行纯化并探究其对肠道菌群失调小鼠的调节作用。以产率、脱色率、多糖含量为指标, 比较 AB-8、D315、D101、HPD-100 四种大孔树脂对百合多糖的纯化效果; 实验分为空白组(生理盐水 10 mg/kg)、模型组(盐酸林可霉素 10 mg/kg)、阳性组(丽珠肠乐 10 mg/kg)、百合多糖低、中、高(50、100、200 mg/kg)剂量组; 以脂多糖(LPS)、血清炎症因子 IL-6、TNF- α 及回肠组织 SIgA 的含量、菌群数量为指标, 评价纯化后的百合多糖对肠道菌群失调小鼠的调节作用。结果表明: D315 大孔树脂纯化效果最佳, 纯化后百合多糖的产率、脱色率、糖含量分别为 $40.82\% \pm 1.28\%$ 、 $35.11\% \pm 1.12\%$ 、 $82.56\% \pm 1.18\%$; 药理实验结果表明: 百合多糖高剂量组(200 mg/kg)效果最佳。与模型组相比, 高剂量组小鼠 LPS、血清炎症因子 IL-6、TNF- α 的含量极显著降低($P < 0.01$), 回肠组织 SIgA 含量极显著增加($P < 0.01$), 肠杆菌、肠球菌的数量显著降低($P < 0.05$), 乳酸杆菌、双歧杆菌的数量显著增加($P < 0.05$)。说明百合多糖对小鼠肠道菌群紊乱具有调节作用。

关键词:百合多糖, 大孔树脂, 肠道菌群, 免疫球蛋白, 炎症因子

Purification of Lily Polysaccharide and Its Regulatory Effect on Intestinal Flora Dysregulation Mice

ZHAO Zhi-meng, ZHAO Hong, WANG Yu-liang, SHEN Yu,
WANG Chao-xing, MENG Fan-ling, ZHANG Man, ZHANG Yu*

(Key Laboratory of New Drug Discovery and Efficacy Toxicology Evaluation, Institute of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China)

Abstract: The lily polysaccharide was purified and explored for its regulation of intestinal dysregulated mice. The purification effects of four macroporous resins AB-8, D315, D101 and HPD-100 on lily polysaccharides were compared by the yields, decolorization rates and polysaccharide contents. The experiment was divided into blank group (saline 10 mg/kg), model group (lincomycin hydrochloride 10 mg/kg), positive group (lizhu intestine 10 mg/kg), and the low, medium and high (50, 100, 200 mg/kg) dose groups of lily polysaccharide. The mouse ileal tissue SIgA, plasma LPS, serum inflammatory factor IL-6, the contents of TNF- α and the number of microflora were used as indicators to evaluate the regulation effect of purified lily polysaccharide on intestinal flora imbalance mice. The results showed that the yields, decolorization rates and polysaccharide content of lily polysaccharide purified by D315 macroporous resin were the highest with $40.82\% \pm 1.28\%$, $35.11\% \pm 1.12\%$ and $82.56\% \pm 1.18\%$, respectively. The results of pharmacological experiments showed that the high dose group of lily polysaccharide had the best effect. Compared with the model group, the LPS contents, serum inflammatory factors IL-6 and TNF- α levels in the high dose group were significantly ($P < 0.01$) decreased, and the ileal tissue SIgA contents was significantly increased ($P < 0.01$), the number of *Enterobacteriaceae* and *Enterococcus* were significantly reduced ($P < 0.05$), while the number of *Lactobacillus* and *Bifidobacteria* were increased ($P < 0.05$). It indicated that lily polysaccharide had a regulatory effect on the intestinal flora disorder in mice.

Key words: lily polysaccharide; macroporous resin; intestinal flora; immunoglobulin; inflammatory factor

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2020)08-0295-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020.08.047

收稿日期: 2019-07-12

作者简介: 赵芷萌(1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然药物活性成分筛选及新药开发, E-mail: zzm1995919@163.com。

* 通讯作者: 张宇(1964-), 女, 硕士, 教授, 研究方向: 天然药物活性成分筛选及新药开发, E-mail: zhangyuhy2003@163.com。

基金项目: 黑龙江省卫生健康委科研项目(2018-493); 佳木斯市科技专项(2016-07); 中国博士后科学基金面上资助项目(2015M571454); 黑龙江省自然科学基金青年项目(QC2018119); 黑龙江省博士后科研基金项目(LBH-Z14204); 黑龙江省教育厅基本科研业务费基础研究项目(2017-KYYWF-0590)。

引文格式:赵芷萌,赵宏,王宇亮,等.百合多糖的纯化及其对肠道菌群失调小鼠的调节作用[J].食品工业科技,2020,41(8):295-300,306.

肠道菌群数量众多、种类丰富,广泛参与多种生理活动,对人类的健康至关重要^[1]。在微生物学研究领域,研究人员发现肠道菌群能够调节肠道运动和分泌,分解食物中的大分子复合多糖,参与营养物质的消化和吸收,促进并维护免疫系统的正常发育和活动等^[2-4]。目前对于治疗肠道菌群失调最常用的药物为抗生素类药物,随着抗生素在临床的广泛应用,其在杀灭致病菌的同时也影响了正常菌群,因此人们开始寻找具有微生态调节作用的天然物质并进行研究^[5]。

百合为百合科植物百合(*L.brownii* F.E. Brown var. *viridulum* Baker.)、卷丹(*Lilium lancifolium* Thunb.)、细叶百合(*L.pumilum* DC.)的干燥肉质鳞叶,味甘、微寒,全球已发现有至少120个品种,其中55种产于中国^[6-8]。百合是国家卫生部审批通过的首批药食两用品之一,《中华人民共和国药典》(2015年版)中所载百合功效是养阴润肺、清心宁神^[9-11]。百合中除含有丰富的淀粉、蛋白质和微量元素等营养物质外,还含有多糖、生物碱、皂苷等多种生物活性成分。

近几年,随着微生态学的发展,微生态理论和方法开始被引入中药的研究中,相关研究表明,植物多糖可以促进肠道粘膜免疫水平、调节肠道微生态菌群、促进肠道健康发育^[12-16]。现代药理研究表明,百合多糖在抗疲劳、抗抑郁、抗菌等方面有很好的疗效^[17],但有关百合多糖对于肠道菌群失调的调节作用研究较少。要保障多糖药理作用,首先需保证其有效含量,因此本文通过比较AB-8、D315、D101、HPD-100四种大孔树脂纯化效果,优选最佳大孔树脂纯化后的百合多糖进行药理实验。以小鼠回肠组织分泌性免疫球蛋白A(SIgA)的含量、血液内毒素(LPS)含量、血清炎症因子白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的含量、菌群数量为评价指标,首次研究纯化后的百合多糖对肠道菌群失调小鼠调节作用,为百合多糖调节胃肠道微生态菌群作用机制的研究百合多糖微生态调节剂的临床使用和进一步开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

百合 粉碎过40目筛,留实验室备用,哈药集团世一堂有限责任公司(批号:17080195);三蒸水 佳木斯大学天然药物化学实验室;95%乙醇、苯酚、浓硫酸 分析纯,天津市瑞金特化学品有限公司;AB-8、D315、D101、HPD-100大孔树脂 上海源叶生物科技有限公司;酶联免疫试剂盒 SiG A、LPS、IL-6及TNF- α 诚吾康肽生物有限公司;清洁级昆明种小鼠 雄性,18~22 g,60只,辽宁长生生物技术股份有限公司(SCXK(辽)2015-0001);盐酸林可霉素 河南天方药业股份有限公司;丽珠肠乐 珠海丽珠集团丽珠制药厂;乳杆菌选择性培养基(LBS琼

脂)、BBL琼脂培养基基础、伊红美蓝琼脂(EMB)、肠球菌琼脂 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

KQ-250DE型数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司;TGL-16M台式高速冷冻离心机 长沙平凡仪器仪表有限公司;RE-2000A旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;FA2004型电子天平 上海舜宇恒平科学仪器有限公司;DL-5-B低速大容量离心机 上海安亭科学仪器厂;粉碎机 上海仪电科学仪器股份有限公司;765型紫外-可见分光光度计 上海仪电第三分析仪器厂;Sunrise吸光酶标仪 瑞士帝肯公司;HITACH7800透射电镜 日本日立有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 百合多糖提取 参照张占军等^[20]的方法并加以改进,采用超声辅助提取百合多糖,称取百合粉100 g,百合粉与三蒸水比为1:10 g/mL置于2000 mL烧杯,在温度70℃、超声功率120 W条件下,于超声波清洗器中提取40 min,提取液经8层纱布过滤,3500 r/min、25℃离心10 min,取上清液,55℃下减压浓缩为原体积的1/5后,加入3倍体积的无水乙醇醇沉至上清液浓度达到85%,4℃放置24 h,3500 r/min、25℃离心15 min,取沉淀,50℃真空干燥得百合粗多糖。按上述操作多次提取百合粉共5 kg^[18]。

1.2.2 百合多糖纯化

1.2.2.1 除蛋白 将1.2.1得到的百合粗多糖配制成5%的多糖溶液,将5%的三氯乙酸与多糖溶液1:1混合,振摇20 min,4℃下放置12 h,3500 r/min、25℃离心15 min取上清液,用0.5 mol/L氢氧化钠溶液调至pH=7,溶液55℃下减压浓缩为原体积的1/10,冻干得除去蛋白后的百合多糖^[19]。

1.2.2.2 大孔树脂纯化 参照廖琴等^[18]的方法并加以改进,将1.2.2.1得到的百合多糖配成浓度为5 mg/mL的多糖溶液,分别称取50 g AB-8、D315、D101、HPD-100 4种已处理好的树脂对百合粗多糖溶液进行吸附实验,调节色谱柱流速为3.5 mL/min,25℃下收集流出液,55℃下减压浓缩为原体积的1/10冻干得纯化后的百合多糖^[20]。

1.2.3 百合多糖含量、脱色率及纯化产率测定

1.2.3.1 葡萄糖标准曲线绘制 参照朱泉^[21]的方法,于波长490 nm处测定吸光度,纵坐标y代表吸光度,横坐标x代表葡萄糖浓度(mg/mL)绘制标准曲线。

1.2.3.2 百合多糖含量测定 配制百合粗多糖及纯化后的百合多糖溶液,浓度为0.1 mg/mL,按上述方法测得吸光度,测量3次,代入线性回归方程计算多糖浓度x(mg/mL),并计算百合粗多糖及纯化后百合多糖的糖含量,计算公式如下:

$$\text{糖含量}(\%) = \frac{x}{0.1} \times 100$$

1.2.3.3 百合多糖脱色率及纯化产率测定 分别按1.2.3.2测定百合粗多糖及纯化后多糖的吸光度,得

脱色率,并计算其纯化产率,计算公式如下:

$$\text{脱色率}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

式中: A_0 : 脱色前吸光度; A_1 : 脱色后吸光度。

$$\text{产率}(\%) = \frac{m_1}{m_0} \times 100$$

式中: m_0 : 纯化前百合多糖质量(mg); m_1 : 纯化后百合多糖质量(mg)。

1.2.4 肠道微生态调节作用研究

1.2.4.1 给药剂量及实验方案 将 60 只昆明雄性小鼠适应性饲养 7 d, 随机分为空白组、模型组、阳性组、百合多糖低、中、高 6 组, 每组 10 只。空白组每天按 10 mL/kg 灌胃生理盐水, 共 21 d; 模型组第 1、2、3 d 按 10 mL/kg 灌胃盐酸林可霉素, 此后每天按 10 mL/kg 灌胃生理盐水, 共 21 d; 阳性组第 1、2、3 d 按 10 mL/kg 灌胃盐酸林可霉素, 此后每天按 20 mg/kg 灌胃丽珠肠乐, 共 21 d; 多糖用组(低、中、高剂量组)第 1、2、3 d 按 10 mL/kg 灌胃盐酸林可霉素(盐酸林可霉素: 64 μ L 盐酸林可霉素用生理盐水稀释至 1 mL), 此后每天按 50、100、200 mg/kg 灌胃经 D315 大孔树脂纯化后的百合多糖, 共 21 d。

1.2.4.2 体重的测定 每 3 d 称 1 次体重、共 10 次(包括适应性饲养 7 d, 共 28 d)。

1.2.4.3 肠粘膜病理标本观察 实验结束后, 取回肠末端组织, 切成 1 mm $\times$ 1 mm 的小块, 采用 2.5% 戊二醛固定, 饿酸后固定, 丙酮脱水, 树脂包埋, 超薄切片, 铝铀染色, 使用透射电镜观察。

1.2.4.4 LPS、IL6 及 TNF- α 的含量测定 实验结束后, 眼球取血, 将上述各组小鼠的静脉血放置 15 min, 使用高速冷冻离心机在 4 $^{\circ}$ C 下进行冷冻离心(5000 r/min, 15 min)收集血清。用酶联免疫吸附试验试剂盒检测血清 LPS、IL6、TNF- α 的含量。

1.2.4.5 回肠组织 SIgA 的含量测定 无菌取小鼠回肠按 1:9 的比例进行组织匀浆, 在 4 $^{\circ}$ C 下进行冷冻离心(5000 r/min, 15 min), 取上清液, 回肠上清液用酶联免疫吸附试验试剂盒检测 SIgA 的含量。

1.2.4.6 造模后、给药后小鼠粪便菌群数量检测 参照罗兰等^[22]的方法加以改进, 粪便逼迫法取造模后(灌胃盐酸林可霉素 3 d 后)的小鼠新鲜粪便及连续给药 21 d 后小鼠粪便 0.1 g 于去离子水处理过的离心管中, 使用生理盐水稀释 10^{-5} , 均匀涂布于双歧杆菌(BBL)、乳酸杆菌(LBS)、大肠杆菌(EMB)、肠球菌(EC)选择培养基中各 5 μ L, BBL 和 LBS 厌氧培养 72 h, EMB 和 EC 需氧培养 24 h, 结果取对数, 菌落计数^[22]。

1.3 数据处理

应用 SPSS 17.0 统计分析软件, 以单因素分析各组之间的差异, 各实验组组间均数比较采用 LSD 检验, 计量资料采用 ($\bar{X} \pm S$) 表示, $P < 0.05$ 为显著差异, $P < 0.01$ 为极显著差异。

2 结果与分析

2.1 百合多糖脱色率及纯化产率测定

由图 1 可知经 AB-8、D315、D101、HPD-100 大

孔树脂纯化的多糖脱色率分别为 $29.12\% \pm 1.13\%$ 、 $35.11\% \pm 1.12\%$ 、 $30.26\% \pm 1.48\%$ 、 $27.22\% \pm 1.79\%$; 纯化产率分别为 $25.23\% \pm 1.13\%$ 、 $40.82\% \pm 1.28\%$ 、 $40.23\% \pm 1.46\%$ 、 $30.22\% \pm 1.33\%$, 其中经 D315 大孔树脂优化后的百合多糖脱色效果最佳, 纯化产率最高。

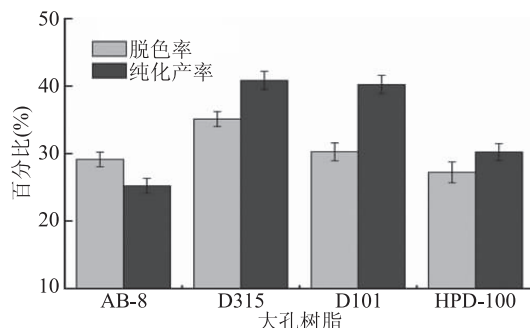


图 1 纯化产率及脱色率值

Fig.1 Purification yields and decolorization rates

2.2 百合多糖糖含量测定

由图 2 可知线性回归方程为: $y = 7.007x + 0.096$, 决定系数 $R^2 = 0.9992$, 百合粗多糖糖含量为 $52.22\% \pm 2.21\%$, 经 AB-8、D315、D101、HPD-100 大孔树脂优化后的百合多糖糖含量分别为 $60.25\% \pm 3.26\%$ 、 $82.56\% \pm 1.18\%$ 、 $65.63\% \pm 2.63\%$ 、 $59.44\% \pm 2.55\%$, 其中经 D315 大孔树脂纯化后的百合多糖糖含量提高最多。

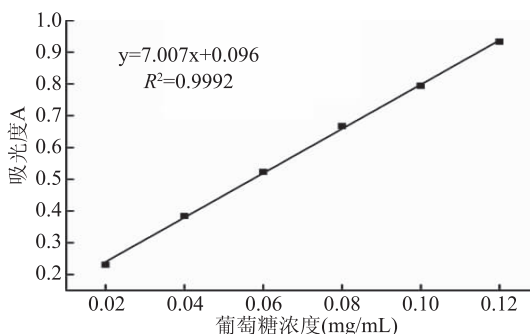


图 2 葡萄糖标准曲线

Fig.2 Standard curve of glucose

2.3 肠道微生态调节作用研究

2.3.1 小鼠体重变化 小鼠体重变化(28 d)如图 3 所示, 实验过程中无小鼠死亡, 6 组小鼠与初始相比体重均有增长。空白组小鼠体重稳步增长, 模型组、阳性组、多糖低、中、高剂量组灌胃盐酸林可霉素 3 d 后(7~10 d)小鼠体重出现下降, 给药后(11~28 d)阳性组、多糖低、中、高剂量组小鼠体重稳步增长。

2.3.2 肠粘膜病理标本观察 透射电镜结果如图 4 所示, 与空白组相比, 模型组小鼠肠粘膜微绒毛排列疏松、长短不一, 可能是由于盐酸林可霉素造成小鼠肠粘膜屏障功能衰竭, 导致肠绒毛损伤脱落; 与模型组相比, 阳性组小鼠肠粘膜微绒毛排列整齐, 基本恢复正常状态, 多糖低剂量组小鼠肠粘膜绒毛虽偶有疏松, 但较模型组比状态有所恢复, 多糖中、高剂量组小鼠肠粘膜绒毛排列整齐、无断裂, 基本恢复与空

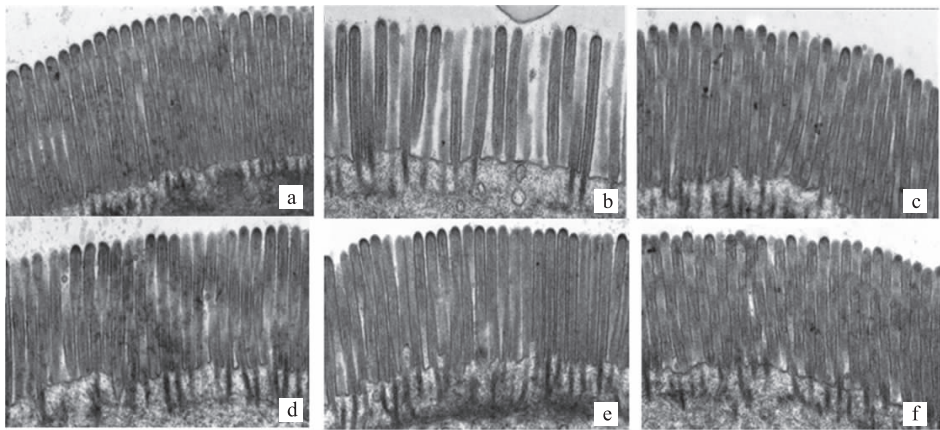


图4 肠粘膜病理标本透射电镜结果(8000×)

Fig.4 Transmission electron microscope results of intestinal mucosa pathological specimens(8000×)

注:a:空白组;b:模型组;c:阳性组;d:多糖低剂量组;e:多糖中剂量组;f:多糖高剂量组。

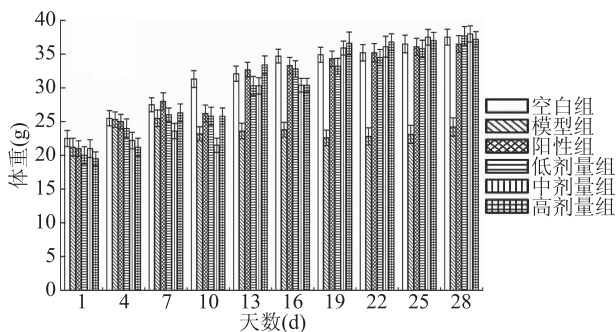


图3 小鼠体重变化

Fig.3 Weight changes in mice

白组状态一致,其中百合多糖高剂量组效果最佳。分析结果为百合多糖可改善肠绒毛形态结构,缓解肠黏膜屏障功能衰竭,减少肠绒毛损伤脱落,使其恢复规则的排列,且随着给药浓度增加,治疗效果越明显^[23]。

2.3.3 LPS、IL-6 及 TNF-α 的含量测定

2.3.3.1 LPS 含量测定 小鼠 LPS 含量如表 1 所示,与空白组相比,模型组小鼠 LPS 含量极显著增加 ($P < 0.01$),可能是由于肠道菌群失调使 LPS 快速释放导致其含量增加;与模型组相比,低剂量组小鼠 LPS 含量显著降低 ($P < 0.05$),阳性组、多糖中、高剂量组极显著降低 ($P < 0.01$),可能是由于百合多糖可改善肠道菌群紊乱,调节肠道菌群失调小鼠并扶植

表1 小鼠 LPS 的含量(n=10)

Table 1 LPS content of mice (n=10)

组别	含量(ng/L)
空白组	16.12 ± 2.52 ***
模型组	29.21 ± 4.08 ##
阳性组	19.10 ± 1.87 ***
低剂量组	23.75 ± 1.16 *
中剂量组	20.75 ± 1.43 ***
高剂量组	19.83 ± 1.05 ***

注:*表示与模型组比较,差异显著, $P < 0.05$,***差异极显著, $P < 0.01$;#表示与空白组比较,差异显著, $P < 0.05$,##差异极显著, $P < 0.01$;表2~表6同。

有益菌的数量,抑制有害菌的数量从而降低 LPS 的含量。结果表明百合多糖可以恢复肠道菌群失调小鼠 LPS 的含量,且高剂量组效果最佳^[24]。

2.3.3.2 IL-6 含量测定 小鼠 IL-6 含量如表 2 所示,与空白组相比,模型组小鼠 IL-6 的含量极显著升高 ($P < 0.01$),可能是由于肠道菌群失调导致促炎因子 IL-6 含量增加;与模型组相比,低剂量组小鼠 IL-6 的含量显著降低 ($P < 0.05$),阳性组、多糖中、高剂量组极显著降低 ($P < 0.01$),可能是由于百合多糖可改善肠道菌群紊乱,调节肠道菌群从而改善炎症因子 IL-6 的含量。结果表明百合多糖可以恢复肠道菌群失调小鼠的 IL-6 的含量,且高剂量组效果最佳^[25]。

表2 小鼠 IL-6 的含量(n=10)

Table 2 Contents of IL-6 in mice(n=10)

组别	含量(pg/mL)
空白组	20.97 ± 8.16 ***
模型组	63.84 ± 11.66 ##
阳性组	24.11 ± 2.56 ***
低剂量组	44.59 ± 13.22 *
中剂量组	34.35 ± 7.29 ***
高剂量组	30.24 ± 2.93 ***

2.3.3.3 TNF-α 含量测定 小鼠 TNF-α 含量如表 3 所示,与空白组相比,模型组小鼠 TNF-α 含量极显著增加 ($P < 0.01$),可能是由于肠道菌群失调导致促炎因子 TNF-α 含量增加;与模型组相比,低剂量小鼠显著降低 ($P < 0.05$),阳性组、中、高剂量组极显著降低 ($P < 0.01$),可能是由于百合多糖抑制 TNF-α 蛋白的合成和分泌,下调其转录水平,从源头上抑制小鼠炎症反应。结果表明百合多糖可以恢复肠道菌群失调小鼠 TNF-α 的含量,且高剂量组效果最佳^[26]。

2.3.4 SIgA 的含量测定 小鼠回肠组织 SIgA 含量如表 4 所示,与空白组比较,模型组小鼠回肠组织 SIgA 极显著降低 ($P < 0.01$),可能是由于肠道菌群失调,炎症因子含量增加导致 SIgA 含量降低,以上结果表明造模成功;与模型组相比,低、中剂量组显著增

表3 小鼠 TNF-α 含量(n = 10)
Table 3 TNF-α content in mice(n = 10)

组别	含量 (pg/mL)
空白组	170.13 ± 4.86 ***
模型组	420.55 ± 60.17 ##
阳性组	180.56 ± 20.57 ***
低剂量组	220.38 ± 26.10 *
中剂量组	190.17 ± 12.44 ***
高剂量组	180.99 ± 4.32 ***

高 ($P < 0.05$) ; 阳性组、高剂量组极显著升高 ($P < 0.01$) , 可能是由于百合多糖通过肠道吸收过程, 作用于肠道黏膜, 增强肠道黏膜免疫功能从而改善 SIgA 的含量。结果表明百合多糖可以恢复肠道菌群失调小鼠 SIgA 的含量, 且高剂量组的效果最佳^[26]。

表4 小鼠回肠组织 SIgA 含量(n = 10)
Table 4 SIgA content in ileum tissues of mice(n = 10)

组别	含量 (pg/mL)
空白组	2.83 ± 0.65 ***
模型组	1.67 ± 0.50 ##
阳性组	2.39 ± 0.24 ***
低剂量组	2.19 ± 0.05 *
中剂量组	2.33 ± 0.48 *
高剂量组	2.37 ± 0.38 ***

2.3.5 造模后、给药后小鼠粪便菌群数量检测
2.3.5.1 造模后小鼠粪便菌群数量检测 造模后小鼠粪便菌群数量如表 5 所示, 与空白组相比, 造模后模型组、阳性组、多糖低、中、高剂量组的小鼠有益菌均显著降低 ($P < 0.05$) , 有害菌均显著升高 ($P < 0.05$) , 可能是由于肠道菌群失调时, 益生菌会大量减少, 有害菌会大量增殖, 破坏肠道环境所致, 以上结果表明本次实验造模成功^[27]。

2.3.5.2 给药后小鼠粪便菌群数量检测 给药后小

表5 造模后小鼠粪便菌群数量检测 (lg CFU/g, n = 10)
Table 5 Fecal flora of mice were detected after modeling (lg CFU/g, n = 10)

组别	双歧杆菌	乳酸杆菌	肠球菌	肠杆菌
空白组	12.21 ± 0.32	11.45 ± 0.22	8.61 ± 0.36	8.69 ± 0.43
模型组	9.44 ± 0.29 #	8.71 ± 0.17 #	11.58 ± 0.32 #	11.07 ± 0.51 #
阳性组	9.21 ± 0.12 #	8.25 ± 0.26 #	11.86 ± 0.16 #	11.77 ± 0.48 #
低剂量组	8.99 ± 0.19 #	8.43 ± 0.23 #	11.77 ± 0.56 #	11.66 ± 0.58 #
中剂量组	9.05 ± 0.65 #	8.58 ± 0.17 #	11.66 ± 0.35 #	11.44 ± 0.65 #
高剂量组	9.33 ± 0.43 #	8.66 ± 0.38 #	11.73 ± 0.44 #	11.87 ± 0.33 #

表6 用药后小鼠粪便菌群数量检测 (lg CFU/g, n = 10)
Table 6 Detection of fecal flora of mice after drug administration (lg CFU/g, n = 10)

组别	双歧杆菌	乳酸杆菌	肠球菌	肠杆菌
空白组	12.21 ± 0.53 *	11.41 ± 0.26 *	8.23 ± 0.17 *	8.58 ± 0.19 *
模型组	9.86 ± 0.35 #	8.65 ± 0.22 #	11.36 ± 0.32 #	11.02 ± 0.71 #
阳性组	11.88 ± 0.26 *	11.19 ± 0.32 *	8.67 ± 0.26 *	8.87 ± 0.63 *
低剂量组	10.33 ± 0.43 *	10.95 ± 0.23 *	8.99 ± 0.42 *	9.09 ± 0.41 *
中剂量组	11.05 ± 0.39 *	11.08 ± 0.34 *	8.56 ± 0.25 *	8.9 ± 0.22 *
高剂量组	11.79 ± 0.12 *	11.22 ± 0.12 *	8.32 ± 0.13 *	8.78 ± 0.21 *

鼠粪便菌群数量如表 6 所示, 与空白组相比, 模型组小鼠双歧杆菌、乳酸杆菌数量均显著降低 ($P < 0.05$) , 肠球菌、肠杆菌数量均显著增加 ($P < 0.05$) , 表明造模成功; 与模型组相比, 给药后的阳性组、多糖低、中、高剂量组小鼠肠球菌、肠杆菌数量均显著降低 ($P < 0.05$) , 双歧杆菌、乳酸杆菌数量均显著增加 ($P < 0.05$) 。这可能是由于肠道内有益菌利用多糖进行代谢后产生了乳酸、乙酸等短链脂肪酸, 降低了肠道内的 pH, 从而抑制肠球菌、大肠杆菌的生长^[27]。结果表明百合多糖能够在一定程度上调节因盐酸林可霉素导致的肠道菌群失调, 且高剂量组效果最佳。

3 讨论与结论

LPS 脂多糖是革兰氏阴性细菌细胞壁中的一种成分, 对宿主是有毒性的。革兰氏阴性细菌在快速生长阶段及裂解死亡时均会释放 LPS, 其中高达 60% 的 LPS 是由于细菌的快速生长释放的。因此肠道菌群失调所致肠道内有害菌增加、有益菌减少导致细菌快速增长释放 LPS。百合多糖治疗菌群失调引起的肠炎过程中有多种免疫因子共同参与。TNF-α 可以促进 T 细胞产生各种炎症因子如白细胞介素-2 (IL-2) 、IL-6 等引起炎症反应, 其中 IL-6 能诱导 B 细胞分化和产生抗体, 并诱导 T 细胞活化增殖、分化, 参与机体的免疫应答, 是炎性反应的促发剂。以 SIgA 为主的体液免疫在肠黏膜系统中起主导作用, 它是防御病菌在肠道黏膜粘附和定值的第一道防线, 对各种内源共生菌及外源入侵的病原体都有抵抗作用^[28-30]。

因此本文以小鼠回肠组织 SIgA 的含量、LPS 含量、血清炎症因子 IL-6、TNF-α 的含量、菌群数量为评价指标, 研究纯化后的百合多糖对肠道菌群失调小鼠调节作用。实验结果表明, D315 大孔树脂纯化百合多糖效果最佳, 纯化产率、脱色率及多糖含量分别为: 40.82% ± 1.28% 、35.11% ± 1.12% 、82.56% ±

1.18%。药理实验结果表明,造模后小鼠有益菌显著降低($P < 0.05$),有害菌显著增加($P < 0.05$);与模型组相比,百合多糖低剂量组小鼠血浆 LPS 含量、血清炎症因子 IL-6、TNF- α 的含量显著降低($P < 0.05$),多糖中、高剂量组含量极显著降低($P < 0.01$),百合多糖低、中剂量组显著提高回肠组织 SIgA 含量($P < 0.05$),高剂量组小鼠含量极显著增加($P < 0.01$),百合多糖低、中、高剂量组肠杆菌、肠球菌的数量显著降低($P < 0.05$),乳酸杆菌、双歧杆菌的数量显著增加($P < 0.05$);肠粘膜病理标本表明,多糖低剂量组小鼠肠粘膜绒毛虽偶有疏松,但较模型组比状态有所恢复,多糖中、高剂量组小鼠肠粘膜绒毛排列整齐、无断裂,基本恢复与空白组状态一致。

张宇等研究黄芪多糖对微生态的调节作用,结果表明黄芪多糖可降低肠道菌群失调小鼠 LPS 的含量^[24]。冯澜用马齿苋多糖治疗结肠炎小鼠,发现小鼠盲肠中双歧杆菌、乳酸杆菌等有益菌明显增多,肠杆菌、肠球菌等有害菌明显下降,同时小鼠体内抗炎细胞因子 IL-10 的水平提高,促炎细胞因子 TNF- α 、IL-6 水平降低^[25]。李东琦等^[26]研究玉屏风多糖对肠道菌群失调小鼠免疫功能影响,其中中、高剂量组小肠 SIgA 的含量均显著高于自然恢复组($P < 0.05$)。王琳等^[27]研究了五味子多糖对小鼠肠道菌群的影响,结果表明五味子多糖对因肠道菌群失调所致有害菌增多有益菌减少的情况有所改善,表明五味子多糖对小鼠肠道菌群紊乱有调节作用。这与本文研究结果相一致。

结果表明百合多糖可能是通过抑制 LPS、IL-6、TNF- α 含量的增加,进而抑制细胞内炎症因子的释放,提高 SIgA 的含量并通过扶植肠道内有益菌、抑制有害菌的含量调节肠道菌群失调。本文为百合多糖调节胃肠道微生态菌群作用机制的研究百合多糖微生态调节剂的临床使用和进一步开发奠定基础。

参考文献

- [1] Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome[J]. Nature, 2012, 486(7402): 207-214.
- [2] Cahenzli J, Balmer M L, McCoy K D, et al. Microbial-immune cross-talk and regulation of the immune system[J]. Immunology, 2013, 138(1): 12-22.
- [3] Li F G, Wu L G, Yue Z H. Effect of probiotic on the growth performance and henhouse environment of broilers[J]. Heilongjiang Animal Sci & Veterin Med, 2006(8): 43-44.
- [4] Rothschild D, Weissbrod O, Barkan E, et al. Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota[J]. Nature, 2018, 555(7695): 210-215.
- [5] Chen C L, Li L J. The research progress of infection microbiology[J]. Foreign Med Sci Epidemiol Lemol, 2005, 32(5): 271-273.
- [6] 陈香秀. 百合的研究进展[J]. 福建热作科技, 2010, 35(2): 45-48.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:

中国医药科技出版社, 2015: 123.

- [8] 罗林明, 裴刚. 中药百合化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(6): 824-837.
- [9] Hou R, Chen J, Yue C, et al. Modification of lily polysaccharide by selenylation and the immune-enhancing activity[J]. Carbohydr Polym, 2016, 142(7): 73-81.
- [10] Sun X. Antitumor and immunomodulatory effects of a water-soluble polysaccharide from *Lilii bulbis* in mice[J]. Carbohydr Polym, 2014, 102(1): 543-549.
- [11] Zhao B, Zhang J, Guo X, et al. Microwave-assisted extraction, chemical characterization of polysaccharides from *Lilium davidii* var. unicolor Salisb and its antioxidant activities evaluation[J]. Food Hydrocolloids, 2013, 31(2): 346-356.
- [12] 周欣, 付志飞, 谢燕, 等. 中药多糖对肠道菌群作用的研究进展[J]. 中成药, 2019, 41(3): 623-627.
- [13] 李东琦, 谭淑雯, 王敏儒, 等. 玉屏风多糖对肠道菌群失调小鼠免疫功能的影响[J]. 中国兽医杂志, 2018, 54(3): 85-87.
- [14] 苏莹莹, 任晓萌, 李缘, 等. 裙带菜多糖及其寡糖对洛哌丁胺诱导便秘小鼠的肠道菌群的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2019, 31(3): 297-301.
- [15] 祁玉丽, 李珊珊, 曲迪, 等. 人参中性多糖对小鼠肠道菌群组成及多样性的影响[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(4): 811-818.
- [16] 祁玉丽, 高坤, 孙印石, 等. 植物多糖对肠道微生态的作用研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2018, 30(4): 489-494.
- [17] Gao J, Zhang T, Jin Z Y, et al. Structural characterisation, physicochemical properties and antioxidant activity of polysaccharide from *Lilium lancifolium* Thunb. [J]. Food Chemistry, 2015, 169(6): 430-438.
- [18] 廖琴, 潘智全, 余高照, 等. 响应面法优化大孔树脂纯化百合多糖研究[J]. 化工中间体, 2015, 11(3): 58-65.
- [19] 唐雨薇. 黄芪均一多糖分离鉴定及微生态调节作用研究[D]. 佳木斯: 佳木斯大学, 2014.
- [20] 张占军, 王富花, 葛洪, 等. 响应面法优化百合多糖超声辅助提取工艺[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(18): 40-44.
- [21] 朱泉. 百合多糖分离纯化、结构鉴定及其生物活性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [22] 罗兰, 陈光, 遇常红, 等. 香菇多糖对微生态失调小鼠肠道菌群及免疫功能的调节作用[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(1): 36-38.
- [23] 黄城龙, 朱利娟, 易想炼, 等. 桦木酸对 T-2 毒素致小鼠肠道氧化损伤的保护作用[J/OL]. 食品科学: 1-9 [2019-10-24]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20190909.1435.055.html>.
- [24] 张宇, 沈宇, 胡新俊, 等. 黄芪多糖对微生态调节作用的物质基础研究初探[J]. 中国微生态学杂志, 2012, 24(2): 113-116, 119.
- [25] 冯澜, 李绍民, 代立娟, 等. 马齿苋多糖对溃疡性结肠炎小鼠肠黏膜细胞因子及肠道菌群的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2015, 27(2): 139-142.
- [26] 李东琦, 谭淑雯, 王敏儒, 等. 玉屏风多糖对肠道菌群失

(下转第 306 页)

- [15] 曲巍,张智,马建章,等.高通量测序研究益生菌对小鼠肠道菌群的影响[J].食品科学,2017,38(1):214-219.
- [16] Larsen N, Vogensen F K, Van d B F W J, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults[J].PLoS One,2010,5(2):e9085.
- [17] Xu J A. Genomic view of the human - bacteroides thetaiotaomicron symbiosis [J]. Science, 2003, 299 (5615): 2074-2076.
- [18] Backhed F. Host-bacterial mutualism in the human intestine [J]. Washington D C: Science, 2005, 307 (5717): 1915-1920.
- [19] Zhang X, Shen D, Fang Z, et al. Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e71108.
- [20] Murri M, Leiva I, Gomez - Zumaquero J M, et al. Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: A case-control study [J]. BMC Medicine, 2013, 11(1): 46.
- [21] Zeng H, Ishaq S L, Zhao F-Q, et al. Colonic inflammation accompanies an increase of β - catenin signaling and Lachnospiraceae/Streptococcaceae bacteria in the hind gut of high-fat diet-fed mice [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2016, 35: 30-36.
- [22] Hansen T, Zhu J, Almeida M, et al. A metagenome - wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes [J]. Nature, 2012, 490(7418): 55-60.
- [23] Kameyama K, Itoh K. Intestinal colonization by a Lachnospiraceae bacterium contributes to the development of diabetes in obese mice [J]. Microbes and Environments, 2014, 29

(4): 427-430.

- [24] Zhang C, Zhang M, Wang S, et al. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice [J]. Isme Journal, 2010, 4 (2): 312-313.
- [25] Scher J U, Sczesnak A, Longman R S, et al. Expansion of intestinal prevotella copri correlates with enhanced susceptibility to arthritis [J]. Elife, 2013, 2(1629): e01202.
- [26] Jiang L, Yujuan W, Qifeng Y, et al. Phycocyanin: A potential drug for cancer treatment [J]. Journal of Cancer, 2017, 8(17): 3416-3429.
- [27] 侯晨晨,沈蓉,刘迪,等.松花粉药理作用及临床应用研究进展[J].中国中医药信息杂志,2017,24(9):124-127.
- [28] Alou M T, Lagier J C, Raoult D. Diet influence on the gut microbiota and dysbiosis related to nutritional disorders [J]. Human Microbiome Journal, 2016, 1: 3-11.
- [29] Vassallo G, Mirijello A, Ferrulli A, et al. Review article: Alcohol and gut microbiota - The possible role of gut microbiota modulation in the treatment of alcoholic liver disease [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2015, 41(10): 917-927.
- [30] Fan P, Liu P, Song P, et al. Moderate dietary protein restriction alters the composition of gut microbiota and improves ileal barrier function in adult pig model [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 43412.
- [31] Zhu L, Qin S, Zhai S, et al. Inulin with different degrees of polymerization modulates composition of intestinal microbiota in mice [J]. Fems Microbiology Letters, 2017, 364(10): 1-14.

(上接第300页)

- 调小鼠免疫功能的影响[J].中国兽医杂志,2018,54(3): 85-87.
- [27] 王琳,高辰哲,崔石阳.五味子多糖的酶解辅助提取及其对小鼠肠道菌群的影响[J].食品研究与开发,2018,39(20): 190-196.
- [28] 郭军文,张敏,姚昀,等.多糖、肠道微生物与免疫之间的

相互影响[J].食品工业科技,2017,38(22):315-320,330.

- [29] 姜东京,张丽,曹雨诞,等.肠道菌群在中药研究中的应用[J].中国中药杂志,2016,41(17):3218-3225.
- [30] Jasso-Padilla I, Juárez-Flores B, Alvarez-Fuentes G, et al. Effect of prebiotics of *Agave salmiana* fed to healthy wistar rats [J]. J Sci Food Agric, 2016, 97(2): 556-563.

《食品工业科技》收录栏目

《食品工业科技》既是反映当前国内外食品工业技术水平的窗口,又是新技术应用推广的桥梁,面向食品、生物等相关专业的高校及科研机构,政府管理机构,大中型食品企业,覆盖食品各分支行业,不论对企业决策者,还是研发人员都能提供有益的帮助。

栏目内容包括:研究与探讨、生物工程、工艺技术、食品安全、分析检测、包装与机械、食品添加剂、贮运保鲜、营养与保健、综述,呈现国内外最前沿的学术成果,为科研人员提供专业指导。