

六种香辛料水提取物对大鼠中两类主要肠道菌分布的影响

薛斌, 李少艇, 彭喜春

(暨南大学食品科学与工程系, 广东广州 510632)

摘要: 肉桂 (*Cinnamomum cassia*), 生姜 (*Zingiber officinale* Rosc), 丁香 (*Syzygium aromaticum*), 茴香 (*Foeniculum vulgare* Mill), 黑椒 (*Piper nigrum* L.) 和胡椒 (*Zanthoxylum bungeanum*) 等六种香辛料均有调节肠道功能紊乱的效果, 但在药理功能却存在差异。本文采用末端限制性片段多态性分析技术, 对摄入这六种香辛料的水提取物 30 d 的大鼠结肠梭菌属 IV 簇和拟杆菌属细菌进行了分析, 发现各种水提取物均能显著改变机体的肠道菌分布, 其中肉桂和丁香的水提取物能显著降低梭菌属 IV 簇细菌和拟杆菌属细菌比值, 其余几种水提取物则相反。此外, 一些特定的 TRF 片段 (89 bp、172 bp 的梭菌和 76 bp、614 bp 的拟杆菌) 被发现显著受到影响, 并最终导致梭菌属 IV 簇细菌和拟杆菌属细菌与对照组相比相似度都非常低, 而且拟杆菌的相似度竟低于 40%。本文首次从肠道菌群的角度比较了不同香辛料对机体功效的可能机制。

关键词: 梭菌属; 拟杆菌属; 香辛料; 提取物; 末端限制性片段多态性分析

文章编号: 1673-9078(2013)7-1501-1504

Effect of Aqueous Extracts of Six Flavoring Materials on the Construction of Two Rats' Colonic Bacteria

XUE Bin, LI Shao-ting, PENG Xi-chun

(Food Science and Engineering Department, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Six flavoring materials, including cinnamon, ginger, clove, fennel seeds, black pepper and wild pepper, showed regulation effect on the gastrointestinal dysfunction. This paper investigated their effects on rats' colonic bacteria of *Clostridium cluster* IV and *Bacteroid* by terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) after rats had been orally administrated the aqueous extract of six materials for one month. The results showed the extracts of six materials showed significant effect on the distribution of gut microflora. Especially, the aqueous extracts of cinnamon and clove significantly decreased the rate of *Clostridium cluster* IV and *Bacteroid*, while the other extracts showed opposite functions. Meanwhile, some fragments such as 89 and 172 bp of *Clostridium*, 76 and 614bp of *Bacteroid*, were significantly changed, which finally induced the very low similarity of colonic microbiota (<40% similarity of *Bacteroid*).

Key words: *Clostridium*; *Bacteroid*; flavors and fragrances; plant extracts; terminal restriction fragment length polymorphism

植物中含有丰富的功能活性成分, 其中大量的组分在胃和小肠中未被直接吸收, 而是进入结肠, 比如植物多酚等, 从而对结肠中的菌群分布产生影响^[1]。而肠道菌对人体健康的影响近年来已经受到大量的关注, 比如它们对糖尿病和肥胖等慢性疾病的密切关系^[2]。因此, 植物性食物的摄入对肠道菌肯定产生一定的影响, 从而影响到人体的健康。

收稿日期: 2013-02-26

基金项目: 国家自然科学基金项目资助 (31271849); 中央高校基本科研业务费专项基金资助项目 (21611414); 国家大学生创新计划资助项目 (101055902)

通讯作者: 彭喜春 (1976-), 男, 博士, 副教授, 主要研究营养与肠道微生物研究

我国饮食中常用香辛料作为调味品, 这些香辛料大都被认为具有保健功能。比如肉桂 (*Cinnamomum cassia*), 生姜 (*Zingiber officinale* Rosc), 丁香 (*Syzygium aromaticum*), 茴香 (*Foeniculum vulgare* Mill), 黑椒 (*Piper nigrum* L.) 和胡椒 (*Zanthoxylum bungeanum*) 等, 这六种香辛料均具有调节肠道功能紊乱的效果^[3]; 更重要的是, 它们还被报道具有治疗糖尿病和预防肥胖的功能^[4-8], 而许多研究发现糖尿病和肥胖与患者肠道中的厚壁菌门和拟杆菌门的细菌有密切关系^[2]。然而, 目前针对这几种植物的功能性成分和药理学进行的大量研究, 几乎均集中于化学成份分析及各成分对机体 (的组织 and 器官) 的功能反应

方面^[4-8]。显然,这些功能性原料对机体的影响现有的理解并不全面。

厚壁菌门和拟杆菌门细菌在人体肠道九个门的细菌菌群中占绝对优势(>98%)^[29],而厚壁菌门中以梭菌纲的含量最丰富(95%)^[10],梭菌纲中与肠道营养吸收和结肠上皮细胞的健康有关的菌包括梭菌属IV、XIVa和XVI簇细菌^[10-12],而梭菌属IV除上述功能外,还产生短链脂肪酸(Short chain fatty acids, SCFAs)^[12];哺乳动物(包括人)肠道中的拟杆菌主要以拟杆菌属为主^[13]。

本研究采用末端限制性片段多态性分析(Terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)比较六种不同的香辛料对大鼠结肠的梭菌属IV簇和拟杆菌属细菌的变化,以期进一步揭示它们可能的功效机制。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

见文献所述^[14]。

1.2 六种香辛料水提取物的制备

根据文献报道的方法进行制备^[15]。

1.3 动物喂饲、取样

根据文献报道的剂量及方法喂饲30 d,然后取结肠内容物^[15]。

1.4 细菌基因组DNA的提取与检测

称取适量结肠内容物,按文献报道的方法提取结肠细菌基因组并检测^[14]。

1.5 PCR和酶切

按文献报道的方法进行PCR和酶切^[14]。

1.6 T-RFLP图谱分析

按文献报道的方法进行图谱分析^[14]。

1.7 数据统计

实验数据采用EXCEL软件进行统计分析。

2 结果与讨论

2.1 六种香辛料对大鼠结肠梭菌属IV簇细菌的影响

如表1所示,六种香辛料的摄入均不同程度地降低大鼠结肠中的梭菌属IV簇细菌,其中以肉桂最为显著($P<0.01$),其次为丁香、花椒和茴香组;干姜的摄入对大鼠结肠梭菌属IV簇的影响差异不显著。

六种香辛料水提取物的摄入对大鼠结肠梭菌的多样性及分布也有不同的影响。从表2的Shannon多样性指数(H值)显示,各种香辛料水提取物的摄入均降低对大鼠结肠梭菌的多样性(H值),但核糖核酸

丰度指标(S值)的结果却规律不明显,仅丁香水提取物显著降低该指标,即末端限制性片段中差异片段总数显著减少,其次为胡椒和花椒组($S=4$);其余组并不产生影响(如茴香和干姜组, $S=6$)或影响不显著(如肉桂组, $S=5$)。六种香辛料水提取物的摄入也使大鼠结肠梭菌属IV簇细菌的分布的均一性降低,其中以茴香组最显著($E=0.45$),亦即一些梭菌的生长受到抑制,另一些梭菌的生长被促进,这种趋势明显,而对照组中梭菌属IV簇细菌的分布相对均一($E=0.83$)。

表1 大鼠结肠中的梭菌属IV簇和拟杆菌属细菌的总峰面积
Table 1 Total peak areas of *Clostridium* cluster IV and *Bacteroid*

in rat colon		
组别	梭菌属IV簇细菌	拟杆菌属细菌
对照组	62650±3650	21795±1057
肉桂组	23050±2101**	24794±1529*
丁香组	36704±3002**	26250±2467*
茴香组	54400±1896*	10208±926**
胡椒组	49966±4533**	12586±1025**
花椒组	40194±1824**	12226±1333**
干姜组	57974±2537	25798±1508**

注:**表示与对照组相比 $P<0.01$,差异极显著;*表示与对照组相比 $P<0.05$,差异显著。

表2 六种香辛料对梭菌属IV簇细菌T-RFLP图谱的多样性和均一性

Table 2 Diversity and evenness of *Clostridium* cluster IV based on the T-RFLP profiles (*Hha* I digest) from the different samples

组别	S	H	E
对照组	6	2.13	0.83
肉桂组	5	1.48	0.64
丁香组	3	1.18	0.74
茴香组	6	1.17	0.45
胡椒组	4	1.49	0.75
花椒组	4	1.38	0.69
干姜组	6	1.48	0.57

注:S:核糖核酸的丰度, $S=$ 末端限制性片段中差异片段总数;H:Shannon多样性指数, $H=-\sum(p_i)(\log p_i)$, p_i 指单一片段的峰面积, $H_{max}=\log_2 S$;E:均一度指数, $E=H/H_{max}$ 。

从对照组的结肠梭菌属IV簇细菌各末端限制性片段(Terminal restriction fragments, TRFs)的分布可以看出,除175 bp外,其余几个片段的比例接近(图1所示),但摄入六种不同的香辛料的水提取物后,172 bp的片段所占比例均有显著升高,其它片段则由于摄入的水提取物不同或者增加或者减少,如肉桂组

89 bp 片段减少, 丁香组的却是 177 bp 的片段减少; 茴香组的 89 bp 减少, 175 bp 的片段显著增加; 胡椒组的以则只有 177 bp 增加, 但 89 bp 的片段却检测不到; 花椒组的 89 bp、175 bp 和 177 bp 的均显著减少; 干姜组的变化与花椒组类似。这些结果表明, 不同香辛料提取物对结肠梭菌属 IV 簇细菌的影响不同, 这可能与它们最终的功效差异有关。

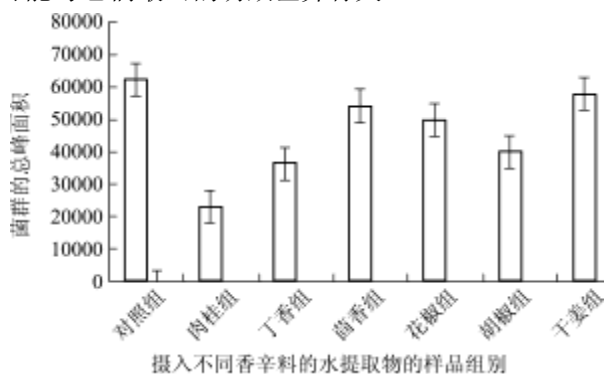


图1 摄入不同香辛料水提取物后大鼠结肠中的梭菌属 IV 簇细菌的总峰面积

Fig.1 Total peaks areas of Clostridium class IV in rat colonic contents after ingested the aqueous extracts of six flavoring materials

表3 实验组与对照组样品中梭菌属 IV 簇和拟杆菌属细菌 T-RFLP 的相似性

Table 3 Multiple-incidence-based similarities of colonic bacterial communities between control and tested samples calculated based on TRFLP incidence profiles of colonic samples

组别	与对照组相比, 两类细菌的相似度/%	
	梭菌属 IV 簇细菌	拟杆菌属细菌
肉桂组	48.62	34.68
丁香组	35.10	33.71
茴香组	35.48	23.93
胡椒组	40.99	15.37
花椒组	41.88	24.85
干姜组	41.55	19.15

进一步分析实验组与对照组的结肠梭菌属IV簇细菌的相似度发现各有差异(表3), 各组的相似度均不足50%, 其中以丁香和茴香差别最大(相似度分别为35.10%和35.48%)。

2.2 六种香辛料对大鼠结肠拟杆菌属细菌的影响

拟杆菌是哺乳动物肠道的另一类优势菌。六种香辛料的水提取物摄入后对拟杆菌的影响比较复杂, 其中肉桂和丁香组的拟杆菌属细菌数量显著增加(P<0.05), 而干姜组增加极显著(P<0.01); 然而, 茴

香、胡椒和花椒组的拟杆菌属细菌数量却极显著地减少(P<0.01)(表1所示)。

不仅如此, 茴香组和胡椒组的核糖核酸丰度指标(S值)和Shannon多样性指数(H值)也明显降低; 干姜组的核糖核酸丰度指标(S值)也有所降低, 但Shannon多样性指数(H值)降低明显; 其余各组与对照组的相比两个指标均改变不明显。六种水提取物摄入后, 除胡椒和花椒组外, 其余各组可检测到的拟杆菌属细菌的分布均一度指数显示变化不明显; 在胡椒和花椒组, 可检测到的拟杆菌属细菌的分布均一度指数明显升高(表4所示)。

表4 六种香辛料对拟杆菌属细菌的 T-RFLP 图谱的多样性和均一性指数的影响

Table 4 Diversity and evenness of Bacteroid based on the T-RFLP profiles (Hha I digest) from the different samples

组别	S	H	E
对照组	6	1.75	0.68
肉桂组	6	1.74	0.67
丁香组	5	1.77	0.76
茴香组	3	1.18	0.74
胡椒组	3	1.29	0.81
花椒组	5	1.93	0.83
干姜组	4	1.23	0.62

注: S: 核糖核酸的丰度, S=末端限制性片段中差异片段总数; H: Shannon 多样性指数, $H = -\sum(p_i)(\log p_i)$, p_i 指单一片段的峰面积, $H_{max} = \log_2 S$; E: 均一度指数, $E = H/H_{max}$ 。

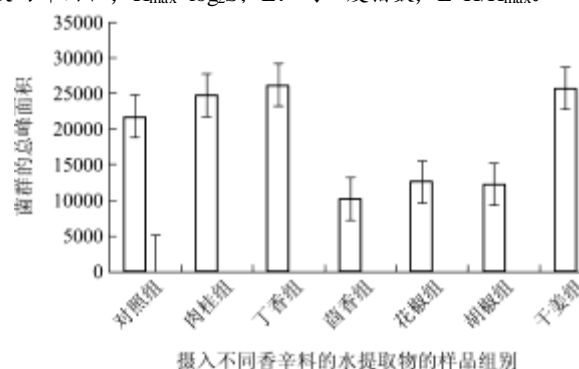


图2 摄入不同香辛料水提取物后大鼠结肠中的拟杆菌属细菌的总峰面积

Fig.2 Total peaks areas of Bacteroid in rat colonic contents after being fed with the aqueous extracts of six flavoring materials

在对照组的结肠拟杆菌属细菌的 TRFs 以 614bp 的最为丰富, 其余各片段的均相对较低(<10%), 但在摄入各种香辛料的水提取物一个月后, 614 bp 片段的丰度均显著降低, 其他片段(比如 76 bp)在各组有不同程度的提高, 见图2所示。

相对于梭菌,拟杆菌属细菌受六种水提取物的影响更大,摄入30 d后,各组结肠拟杆菌的相似度低于35%,其中以胡椒组和干姜组对拟杆菌的影响最大,最终相似度不足20%(分别为15.37%和19.15%),见表4所示。

3 结论

3.1 由于肉桂等六种香辛料均被报道具有调节胃肠功能紊乱的功效,但实际上它们在中药应用以及在药理学研究中发现功能是有差异的。基于这点,本文比较了这六种香辛料水提取物分别摄入30 d后对大鼠结肠梭菌属IV簇细菌和拟杆菌属细菌分布的影响,以期揭示它们功效差异的更多可能机制。

3.2 结果显示,各种水提取物均能显著改变机体的肠道菌分布,其中肉桂和丁香的水提取物能显著降低梭菌属IV簇细菌和拟杆菌属细菌比值,其余几种水提取物则相反。因此,能降低梭菌属IV簇细菌和拟杆菌属细菌比值的主要是肉桂和丁香组,其次是干姜组;其余组与对照组相比,两者的比值均不同程度的增加。此外,一些特定的TRF片段(89 bp、172 bp的梭菌和76 bp、614 bp的拟杆菌)被发现显著受到影响,并最终导致梭菌属IV簇细菌和拟杆菌属细菌与对照组相比相似度都非常低,而且拟杆菌的相似度竟低于40%。

3.3 近年来,肠道菌群与糖尿病和肥胖等慢性疾病的关系引起了大量的关注^[16-17]。研究发现,糖尿病或肥胖患者体内的厚壁菌门(梭菌纲)细菌的比例显著增加^[2]。然而,随着饮食中能量的降低,体重减轻,拟杆菌的数量却相应的增长^[9]。肉桂和丁香已经在别的实验和医学中证明了它们在治疗II型糖尿病的疗效^[3-4,6]。我们的结果显示,肉桂和丁香组均能显著降低梭菌属IV簇细菌和拟杆菌属细菌比值,即促进拟杆菌和抑制梭菌,从肠道微生物的角度进一步验证了这两者在糖尿病或肥胖方面的预防或治疗的潜力。

3.4 本文首次从肠道菌群的角度比较了不同香辛料对机体功效的可能机制。

参考文献

- [1] Laparra J M, Sanz Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals [J]. *Pharmacol Res*, 2010, 61: 219-225
- [2] Tumbaugh P J, Hamady M, Yatsunencko T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins [J]. *Nature*. 2009, 457: 480-484
- [3] 高学敏. 中药学[M]. 人民卫生出版社, 2000
Gao X M. Chinese Medicine [M]. People's Medical

Publishing House, 2000, 793-829

- [4] Soni R, Bhatnagar V. Effect of Cinnamon (*Cinnamomum Cassia*) intervention on blood glucose of middle aged adult male with non insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) [J]. *Ethno-Med*, 2009, 3: 141-144
- [5] Markey O, McClean C M, Medlow P, et al. Effect of cinnamon on gastric emptying, arterial stiffness, postprandial lipemia, glycemia, and appetite responses to high-fat breakfast [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2011, 10: 78-87
- [6] Kuroda M, Mimaki Y, Ohtomo T, et al. Hypoglycemic effects of clove (*Syzygium aromaticum* flower buds) on genetically diabetic KK-A(y) mice and identification of the active ingredients [J]. *J Nat Med*, 2012, 66(2):394-399
- [7] Abdulrazaq N B, Cho M M, Win N N, et al. Beneficial effects of ginger (*Zingiber officinale*) on carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Br J Nutr*, 2011, 12: 1-8
- [8] Aggarwal B B. Targeting inflammation-induced obesity and metabolic diseases by curcumin and other nutraceuticals [J]. *Annu Rev Nutr*, 2010, 30: 173-199
- [9] Ley R E, Peterson D A, Gordon J I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine [J]. *Cell*, 2006, 124: 837-848
- [10] Eckburg P B, Bik E M, Bernstein C N, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora [J]. *Science*, 2005, 308: 1635-1638
- [11] Pryde S E, Duncan S H, Hold G L, et al. The microbiology of butyrate formation in the human colon [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, 217: 133-139.
- [12] Woodmansey E J. Intestinal bacteria and ageing [J]. *J Appl Microbiol*, 2007, 102: 1178-86.
- [13] George M G, ed. The *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes* (*Mollicutes*), *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 4 (2nd ed.) [M]. New York: Springer, 2010
- [14] 黄丽珠, 詹宏林, 王聪, 等. 肉桂水提取物对大鼠肠道梭菌属 IV 簇细菌和拟杆菌的影响 [J]. *食品工业科技*, 2012, 33(18): 124-127
Huang L, Zhan H, Wang C, et al. Effect of aqueous *Cinnamomum cassia* extracts on gastrointestinal *Clostridium* cluster IV and *Bacteroides* in rats [J]. *Sci. & Technol. Food Industry*, 2012, 33(18): 124-127
- [15] 张志超, 黄丽珠, 王聪, 等. 六种香辛料的水提取对大鼠肠道

- 乳酸菌影响的研究[J].肠外与肠内营养,2013,20(1):33-36
- Zhang Z, Huang L, Wang C, et al. Impact of aqueous extracts from six flavoring materials on rats' gut *Lactobacilli* [J]. Parent. & Enter. Nutr., 2013, 20(1): 33-36
- [16] Dore J. Gut microbiota in health and disease [R]. In: Report of the 2nd International Workshop in Amsterdam, 2007
- [17] Vireze A, Holleman H, Zoetendal E G. The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition [J]. Diabetol, 2010, 53: 606-613

现代食品科技