

基于 SHIME 研究橘皮汤对肠道菌群结构的影响

罗玉霜^{1,2}, 伍静仪^{1,2}, 刘世锋^{1,2}, 康信聪^{1,2}, 王蕾^{2,3}, 张志旭^{1,2,4}, 刘东波^{1,2,4,5}

(1. 湖南农业大学园艺学院, 湖南长沙 410128) (2. 国家中医药管理局亚健康干预技术实验室, 湖南长沙 410128)
(3. 长沙能峰生物科技有限公司, 湖南长沙 410128) (4. 植物功能成分利用省部共建协同创新中心, 湖南长沙 410128) (5. 湖南作物种质创新与资源利用重点实验室, 湖南长沙 410128)

摘要:本研究基于人体肠道微生态系统模拟装置 (simulator of the human intestinal microbial ecosystem, SHIME), 引入人体肠道微生物模拟人体体外微生态, 通过 16S rRNA 高通量测序技术分析橘皮汤对肠道菌群的影响, 通过气相色谱技术分析橘皮汤对肠道菌群代谢产物短链脂肪酸的影响。结果显示橘皮汤干预后韦荣氏球菌属水平相对丰度在干预期下降了 33.65%、在维持期下降了 92.78%, 克雷伯菌属水平相对丰度在干预期下降了 63.60%、在维持期下降了 67.82%, 巨单胞菌属水平相对丰度在干预期升高了 27.5%、在维持期升高了 62.61%; 短链脂肪酸中乙酸含量先下降后上升, 总体增加了 3.21%, 丙酸含量减少了 45.43% ($p<0.01$), 异丁酸、丁酸、异戊酸与戊酸的含量显著增加 ($p<0.01$), 分别增加了 52.94%、40.86%、48.94%和 80.00%。橘皮汤干预能起到改变肠道微生物多样性的功效, 并具有调节菌群丰度水平的作用, 表现出抑制韦荣氏球菌属、克雷伯菌属等肠道有害微生物的生长, 并对肠道菌群代谢产物短链脂肪酸的产生有一定的促进作用, 有效改善了人体肠道菌群结构。

关键词: 橘皮汤; 肠道菌群; 人体肠道微生态模拟系统 (SHIME 系统); 16S rRNA; 短链脂肪酸; 气相色谱

文章篇号: 1673-9078(2021)04-7-15

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.4.0782

Study on the Effect of Jupii Decoction on the Structure of Intestinal Flora Based on SHIME

LUO Yu-shuang^{1,2}, WU Jing-yi^{1,2}, LIU Shi-feng^{1,2}, KANG Xin-cong^{1,2}, WANG Lei^{2,3}, ZHANG Zhi-xu^{1,2,4},
LIU Dong-bo^{1,2,4,5}

(1. Horticulture and Landscape College, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

(2. State Key Laboratory of Subhealth Intervention Technology, Changsha 410128, China)

(3. Changsha Nengfeng Biotechnology Co. Ltd., Changsha 410128, China) (4. Co-Innovation Center of Education Ministry for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Changsha, Changsha 410128, China) (5. Hunan Key Laboratory of Crop Germplasm Innovation and Subhealth Intervention Technology, Changsha 410128, China)

Abstract: This study was based on the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME), and human intestinal microorganisms were introduced to simulate *in vitro* the human microbial ecology. The effects of jupii decoction on intestinal flora were examined by 16S rRNA high-throughput sequencing technology, and the effects of jupii decoction on the metabolites of intestinal microflora, short-chain fatty acids (SCFAs), were investigated by gas chromatography. The results showed that after the intervention of jupii decoction, the relative abundance of *Veronica* decreased by 33.65% during the intervention period and by 92.78% during the maintenance period. The relative abundance of *Klebsiella* decreased by 63.60% and 67.82%, respectively, during the intervention and maintenance periods, while that of *Macromonas* increased by 27.5% and 62.61% during the intervention and maintenance periods, respectively. The content of acetic acid among

引文格式:

罗玉霜,伍静仪,刘世锋,等.基于 SHIME 研究橘皮汤对肠道菌群结构的影响[J].现代食品科技,2021,37(4):7-15

LUO Yu-shuang, WU Jing-yi, LIU Shi-feng, et al. Study on the effect of Jupii decoction on the structure of intestinal flora based on SHIME [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(4): 7-15

收稿日期: 2020-08-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81773850); 湖南省科技重大专项 (2017SK1020); 长沙市科技项目 (kh1801123); 湖南农业大学青年基金 (19QN26)

作者简介: 罗玉霜 (1995-), 女, 在读硕士, 研究方向: 功能产品开发与评价研究

通讯作者: 刘东波 (1970-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 功能产品开发与评价研究

the short chain fatty acids decreased first and then increased (by 3.21% in general), while the content of propanoic acid decreased by 45.43% ($p<0.01$). The contents of isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid and valeric acid increased by 52.94%, 40.86%, 48.94% and 80.00%, respectively. The intervention with jupi decoction can change the diversity of intestinal microflora, regulate the level of microbial abundance, exhibit inhibitory effects on the growth of harmful intestinal microorganisms such as *Veronica* and *Klebsiella*, and promote the production of intestinal microbial metabolites, short chain fatty acids, which improves effectively the structure of human intestinal flora.

Key words: jupi decoction; intestinal flora; SHIME systems; 16S rRNA; short-chain fatty acids; gas chromatography

肠道是人体巨大的微生态系统, 定植于肠道的微生物集合统称为肠道菌群^[1]。正常情况下, 肠道各菌属组成及数量处于健康的平衡状态, 形成与人体密不可分的互利共生关系, 从而维持宿主正常的营养物质转化、能量代谢、免疫功能等。若菌群结构改变或失调, 即肠道内益生菌减少、致病菌增加, 即引起机体代谢紊乱, 导致糖尿病等多种疾病的发生^[2]。目前国内外对药物与肠道菌群的相互作用研究已成为热点。橘皮汤首载于《金匱要略》, 由陈皮、生姜组成, 其主要成分为橙皮苷、川陈皮素及 6-姜酚, 常用于治疗胃中寒冷、呕吐恶心、呃逆暖气^[3]。杨志宏等^[4]发现橘皮汤可对抗化疗后所致的恶心与呕吐。姜明旭等^[5]发现服用橘皮汤配以针刺对治疗颅脑术后顽固性呃逆有显著疗效。现代医学研究认为, 胃肠道消化系统与呕吐、呃逆、暖气等症状直接相关。而目前对橘皮汤的研究主要集中在生姜、陈皮及其组方的药物动力学及临床降逆止呕功能方面, 对橘皮汤作为药食同源的中药食材在胃肠道中影响的研究较少。

SHIME^[6-8] (Simulator of human intestinal microbial ecosystem) 系统是比利时根特大学设计的人体肠道微生态系统模拟装置, 是一种人体体外胃肠道生态模拟系统, 包括模拟消化系统、蠕动泵系统、温度控制系统、pH 调节系统。由于能够有效模拟人体的消化及肠道微生态环境, 从而受到越来越多研究者的关注, 如 Katia Sivieri 利用 SHIME 评估新鲜橙汁和巴氏杀菌橙汁对肠道菌群及短链脂肪酸的影响^[9]; Ana M. Rovalino-Córdova 利用 SHIME 研究豆类结构对微生物群利用植物营养素的影响^[8]; Lei Liu 利用 SHIME 研究万古霉素对肠道菌群的致病作用^[10]等。肠道菌群影响机体的主要方式之一是产生短链脂肪酸, 短链脂肪酸是肠道菌群发酵膳食纤维的终产物, 是碳原子数为 1~6 溶于水的游离脂肪酸, 是微生物自身及宿主肠上皮细胞的能量来源, 促进细胞生长, 抑制有害菌的生长^[11]。本研究基于 SHIME 系统, 通过 16S rRNA 高通量测序技术分析橘皮汤对肠道菌群的影响, 通过气相色谱技术分析橘皮汤对肠道菌群代谢产物短链脂肪酸的影响。为橘皮汤的食疗功能提供有效的数据支持, 及其保健品的开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器

XS205 十万分之一分析天平, 德国 METTLER TOLEDO 公司; QL-901 Vortex 涡混仪, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; 2-16R 高速冷冻离心机, 湖南恒诺仪器设备有限公司; GC-2010 气相色谱仪, 日本岛津公司; LDZX-75KBS 立式压力蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; PL403 分析天平, METTLER TOLEDO; 双列六孔水浴锅与 SHIME 系统, 北京佳德精密科技有限公司。

1.1.2 试剂

阿拉伯半乳聚糖、木聚糖、胰蛋白酶、生物素、泛酸盐、烟酰胺、硫胺、甲萘醌、对-氨基苯甲酸, 上海源叶生物科技有限公司; 淀粉、葡萄糖、半胱氨酸、碳酸氢钠、吐温 80、氯化钠、磷酸氢二钾、氯化钙、七水硫酸镁、一水硫酸锰、七水硫酸铁、七水硫酸钴、七水硫酸锌、五水硫酸铜、硫酸铝钾、硼酸、钼酸钠、氯化镍、亚硒酸钠、维生素 B12、氯化钠、胃蛋白酶、36.5%浓盐酸、氢氧化钠、碳酸氢钠, 国药集团化学试剂有限公司; 酵母浸出粉, 上海盛思生化科技有限公司; 细菌学蛋白胨, 广东环凯微生物科技有限公司; 果胶, 河南三化生物科技有限公司; 血红素、PBS 固体粉末 (BOMEI), 猪胆盐, 麦克林。

标准品: 乙酸 (批号: J1811168)、丙酸 (批号: G1827115)、正丁酸 (批号: 50504)、异丁酸 (批号: D1713230)、正戊酸 (批号: H1822061)、异戊酸 (批号: K1813199)、己酸 (批号: E1811088)、2-乙基丁酸 (批号: C10506873)、共计 8 个, 正丁酸, 上海源叶生物科技有限公司; 乙酸、丙酸、异丁酸、正戊酸、异戊酸、己酸、2-乙基丁酸, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.2 食材

生姜, 长沙滨湖大市场; 陈皮, 养天和大药房。

1.3 方法

1.3.1 橘皮汤的制备

称取生姜 10 g, 陈皮 5 g, 以 6 倍量的蒸馏水, 加热回流提取 2 h, 趁热过滤; 药渣再以 6 倍量的蒸馏水加热回流提取 2 h。合并提取液, 置 4 °C 冰箱保存备用。

1.3.2 模拟消化方法

系统模拟实验方法包括: 系统时间、速度及其他参数设定, 粪便接种液制备, 肠道微生态的增值和稳定, 胃和小肠消化液、营养液制备, 以及模拟消化步骤^[12,13]。

消化液及食物营养液制备: 消化液的制备为胃液和胰液的配置与储存。胃液的配置方法: 准确称取 2.0 g NaCl、3.2 g 胃蛋白酶以及 7 mL 36.5% 浓盐酸, 无菌蒸馏水定容至 100 mL。胰液的配置方法: 准确称取 6.0 g 胆汁盐、0.9 g 胰蛋白酶、12.5 g 碳酸氢钠, 无菌蒸馏水定容至 1000 mL。配置好的消化液贴好标签置于 4 °C 冰箱保存。

食物营养液的制备为基础营养液、微量元素液、维生素液的配置与储存。基础营养液配置方法: 称取 3.0 g 淀粉、0.4 g 葡萄糖、2.0 g 果胶、1.0 g 阿拉伯半乳聚糖、1.0 g 木聚糖、3.0 g 酵母提取物、0.4 g 碳酸氢钠、4.0 g 蛋白胨、0.5 g 半胱氨酸、1 mL 吐温 80, 无菌蒸馏水定容至 1000 mL。微量元素①液配置方法称: 取 1.0 g 磷酸氢二钾、0.125 g 血红素、2.0 g 氯化钠、0.2 g 氯化钙、0.2 g 七水合硫酸镁, 无菌蒸馏水定容至 250 mL。微量元素②液配置方法: 称取 0.1 g 硼酸、0.1 g 亚硒酸钠、5.0 g 二水合硫酸锰、1.0 g 硫酸钴、0.1 g 钼酸钠、1.0 g 六水合氯化镍、0.1 g 硫酸铝、0.1 g 五水合硫酸铜、1.0 g 硫酸锌、1.0 g 七水合硫酸铁, 无菌蒸馏水定容至 100 mL。维生素液配置方法: 称取 0.25 g 烟酰胺、0.2 g 硫胺、0.25 g 对-氨基苯甲酸、0.025 g 维生素 B12、0.5 g 泛盐酸、0.05 g 甲萘醌、0.1 g 生物素, 无菌蒸馏水定容至 50 mL。配置好的食物营养液贴好标签置于 4 °C 冰箱保存待用。基础营养液与微量元素液以及维生素液按照体积比 1000:10:10:1 混合成食物营养液。

粪便接种液的制备: 采集 1 名年龄在 20~35 岁, 并且在过去半年未使用抗生素药物的健康宿主。称取新鲜粪便 50 g 加入 250 mL 接种液 (无菌 PBS 缓冲液 0.1 M, pH=7.4), 涡混仪上混匀 5 s, 静置 10 min 取上层液在冷冻离心机中于 4 °C、1000 r/min 离心 10 min, 取离心后的上层液置于 50 mL 离心管中, 贴好标签后置于 -80 °C 冰箱保存。

肠道微生物的定植: 在 SHIME 系统模型的升结

肠、横结肠、降结肠中分别加入 540 mL、864 mL、540 mL 的食物营养液及 60 mL、96 mL、60 mL 的粪便接种液, 在 37 °C 恒温水浴、磁力搅拌器搅拌下厌氧培养 36 h, 并用盐酸 (0.05 mol/L) 和氢氧化钠 (0.1 mol/L) 将升结肠、横结肠、降结肠模拟罐的 pH 值分别保持在 5.5~6.0, 6.0~6.4, 6.5~6.9 之间。培养期间每 6 h, 通氮气 10 min, 保证定植过程的厌氧环境。

SHIME 系统模拟消化步骤: 定植成功后, 模拟东方人进食习惯分别在每天 9:00、15:00、21:00 进料, 每次加入食物营养液的量为 260 mL (干预期时为早上 9:00 进食以 140 mL 混合营养液与 120 mL 的橘皮汤共 260 mL 混合后再加入), 进料完毕后立即泵入 10 mL 左右胃液, 使胃模拟罐的 pH 稳定于 2.0~2.3 之间。料液和胃液混合并在胃模拟罐中反应 2 h 后全部泵入小肠模拟罐, 同时开启控制胰液蠕动泵泵入 120 mL 胰液, 使小肠模拟罐 pH 保持在 6.6~7.0 之间, 4 h 后小肠模拟罐到升结肠模拟罐的蠕动泵开启, 料液全部泵入升结肠模拟罐, 用盐酸 (0.05 mol/L) 和氢氧化钠 (0.1 mol/L) 调节 pH 在 5.5~6.0 之间, 发酵 6 h 后升结肠模拟罐蠕动泵开启, 泵出 400 mL 消化液至横结肠, 用盐酸 (0.05 mol/L) 和氢氧化钠 (0.1 mol/L) 调节 pH 在 6.0~6.4 之间, 消化液在横结肠发酵 6 h 后将其蠕动泵开启, 泵出 400 mL 消化液至降结肠, 用盐酸 (0.05 mol/L) 和氢氧化钠 (0.1 mol/L) 调节 pH 在 6.5~6.9 之间, 再发酵 6 h 后将其蠕动泵开启, 泵出 400 mL 废液至废液桶。每个模拟罐中放入磁力搅拌子, 经磁力搅拌器驱动搅拌子旋转来模拟胃肠道的蠕动; 每次进食后向模拟罐中通入 10 min 氮气来模拟实现胃肠道中的无氧环境, 氮气由外部氮气罐经由导管通过密封盖上的微孔进入胃模拟管, 再经由降结肠模拟罐排出废液的导管排出。

SHIME 系统模拟包括三个时期, 为肠道菌群定植稳定期、橘皮汤干预期、橘皮汤干预后的维持期。稳定期与维持期每餐进料只有食物营养液, 持续 5 d; 干预期每天早上进料含有食物营养液与橘皮汤, 中午与晚上喂食只有食物营养液, 持续 3 d。

样品: 取稳定期、干预期、维持期最后一天升结肠、横结肠、降结肠模拟罐消化前后消化液为样品。

1.3.3 16S rRNA 高通量测序技术分析消化液样品中微生物的多样性

采用 Nanodrop 对总 DNA 进行定量, 样品上样量为 5 μ L, 电泳时间为 20 min, 并通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量。使用紫外分光光度检测测得 OD₂₆₀/OD₂₈₀ (即核酸吸收的最高峰/蛋白吸收的最高峰) 在 2.0 左右, 纯度符合要求。PCR 扩增对样品

DNA 的 16S rRNA 可变区 V3-V4 进行 PCR 扩增, 前引物序列为 ACTCCTACGGGAGGCAGCA, 后引物序列为 GGACTACHVGGGTWTCTAAT。扩增成功后, 制备测序文库, 基于 Illumina Novaseq-PE250 平台对样品进行高通量测序, PCR 扩增及测序工作由上海派森诺生物科技股份有限公司完成。

1.3.4 短链脂肪酸含量的测定

1.3.4.1 GC 分析条件

DB-FATWAX UI (30 m×0.250 mm×0.25 μm) 毛细管色谱柱, 载气为高纯氮气, 柱流量 1.5 mL/min, 升温程序为^[10]: 初始温度 70 °C, 保持 1 min, 以 15 °C/min 升至 160 °C, 保持 6 min, 再以 30 °C/min 升至 210 °C, 保持 5 min; 进样口温度 250 °C, 检测器温度 250 °C, 分流比 19:1, 进样量 0.5 μL。

1.3.4.2 标准品溶液制备

对 8 个短链脂肪酸混合标准溶液的制备, 精密称量乙酸 20.9 mg、丙酸 19.9 mg、异丁酸 9.5 mg、丁酸 10.1 mg、异戊酸 9.2 mg、戊酸 10.0 mg、己酸 9.3 mg、2-乙基丁酸 9.6 mg, 并用 1%甲酸水定容至 10 mL, 制成混合标准品母液, 将母液稀释 1、2、5、10、100、500、100 倍后过 0.45 μm 水膜, 置 4 °C 冰箱存放备用。

1.3.4.3 样品溶液制备

取 2 mL 消化液至离心管中, 加入 1%甲酸水^[14], 涡混仪上混匀 30 s, 加入 1 μL 内标 (2-乙基丁酸), 混匀, 再以 8000 r/min 离心 10 min, 移取上清液过 0.45 μm 水膜进行气相色谱分析。

1.3.4.4 数据处理

实验结果以平均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用 *t* 检验, *p*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 测序数据和聚类分析

细菌 16S rDNA 高通量测序得到有效序列量有 1370867 条, 高质量序列量有 1029466 条。在 97% 相似度标准下聚类分析, 共得到 7334 个 OTU, 其相对应的 OTU 数目见图 1。结果显示在升结肠与横结肠中稳定期的 OTU 数目最多分别为 475 和 1012, 在降结肠中干预期的 OTU 数目最多为 1262, 说明在升结肠与横结肠中稳定期肠道菌群的种类更丰富, 在降结肠中干预期肠道菌群的种类更丰富, 经过橘皮汤干预后肠道菌群种类有所减少。

为进一步比较样本间的物种组成差异, 实现对各样本的物种丰度分布趋势的展示, 使用热图进行物种

组成分析。结果如图 2 所示, 巨单胞菌属 (*Megamonas*) 在维持期升结肠丰度最高, 双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 在稳定期升结肠丰度最高, 不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 在维持期横结肠丰度最高, 拟杆菌属 (*Bacteroides*) 稳定期降结肠丰度最高, 韦荣氏球菌属 (*Veillonella*) 在稳定期升结肠丰度最高, 克雷伯菌属 (*Klebsiella*) 在稳定期降结肠丰度最高, 萨特氏菌属 (*Sutterella*) 在干预期升结肠丰度最高, 代尔夫特菌属 (*Delftia*) 在维持期降结肠丰度最高。经橘皮汤干预后巨单胞菌属、不动杆菌属、萨特氏菌属及代尔夫特菌属等菌属丰度升高, 拟杆菌属、韦荣氏球菌属及克雷伯菌属等菌属丰度降低。

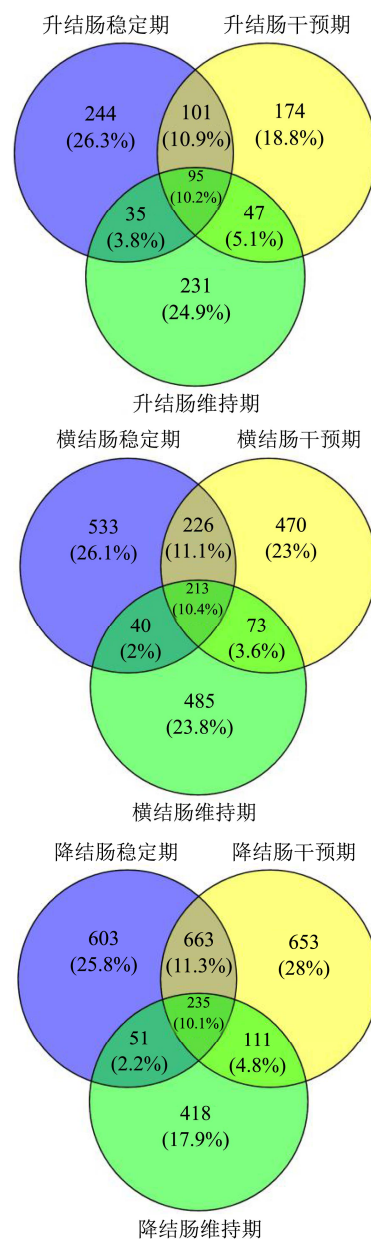


图 1 OTU 分布韦恩图

Fig.1 Venn diagram showing the distribution of OTU

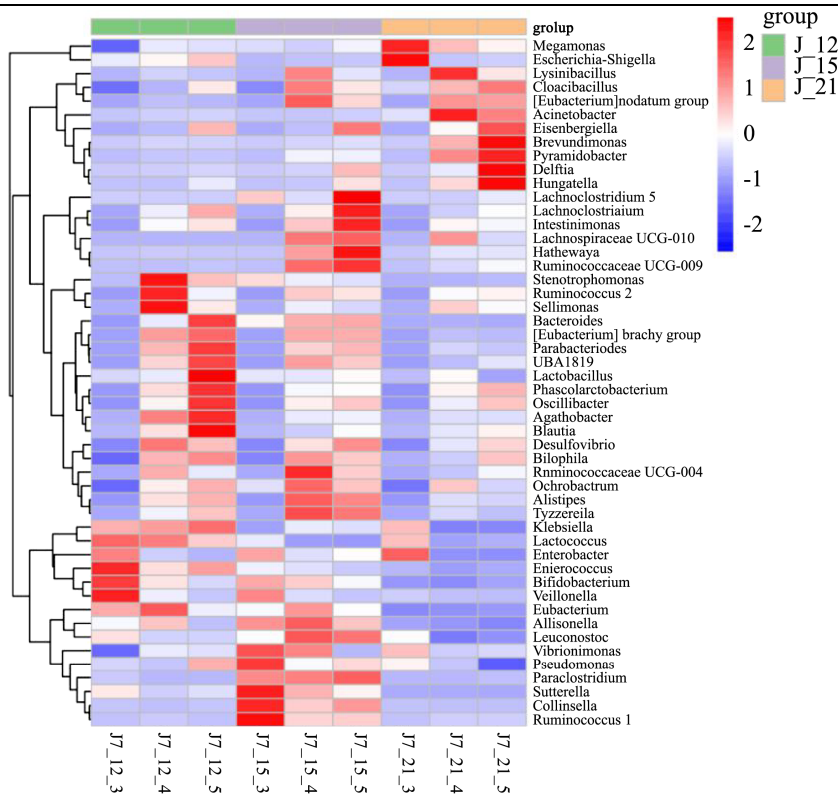


图2 物种聚类的属水平物种组成热图

Fig.2 Species composition thermogram at genus level based on species clustering

注: J7-12 代表稳定期, J7-15 代表干预期, J7-21 代表维持期; J7-12-3 代表升结肠稳定期, J7-15-3 代表升结肠干预期, J7-21-3 代表升结肠维持期; J7-12-4 代表横结肠稳定期, J7-15-4 代表横结肠干预期, J7-21-4 代表横结肠维持期; J7-12-5 代表降结肠稳定期, J7-15-5 代表降结肠干预期, J7-21-5 代表降结肠维持期。

表1 微生物区系属水平相对丰度 (%) 分布

Table 1 Relative abundance (%) distribution of microflora at genus level

分类	稳定期			干预期			维持期		
	升结肠	横结肠	降结肠	升结肠	横结肠	降结肠	升结肠	横结肠	降结肠
巨单胞菌属	2.80	28.92	27.47	26.59	24.06	31.02	76.86	46.09	35.35
双歧杆菌属	73.16	33.87	17.76	47.61	39.34	25.49	2.57	0.38	5.63
韦荣氏球菌属	13.94	2.47	0.62	9.13	1.65	0.52	0.86	0.24	0.13
克雷伯氏菌属	1.54	1.66	2.02	0.32	0.82	0.76	1.44	0.10	0.14
大肠-志贺氏杆菌属	1.46	2.05	3.11	0.35	0.61	0.70	7.21	0.62	0.84
拟杆菌属	含量极少	4.26	15.11	5.66	9.44	9.74	0.95	1.27	0.09
不动杆菌属	0.10	1.10	1.43	0.06	0.13	1.19	3.37	34.85	22.67

2.2 消化液样品中的细菌物种鉴定及菌群结构分析

门水平物种组成柱状图如图3所示。优势菌群为厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria) 及放线菌门 (Actinobacteria)。经橘皮汤干预后, 厚壁菌门的相对丰度增加, 放线菌门的相对丰度减少。

属水平分布如表1所示, 三个时期不同结肠菌群的差异较大。经橘皮汤干预后, 巨单胞菌属相对丰度

在干预期升高了 27.5%、在维持期升高了 62.61%; 韦荣氏球菌属相对丰度在干预期下降了 33.65%、在维持期下降了 92.78%, 克雷伯氏菌属相对丰度在干预期下降了 63.60%、在维持期下降了 67.82%; 双歧杆菌属在维持期下降明显, 大肠-志贺氏杆菌属 (*Escherichia-Shigella*) 在干预期明显下降, *Bacteroides* 拟杆菌属在维持期明显下降, 不动杆菌属在维持期显著上升。

属水平物种组成柱状图如图4所示。升结肠、横结肠、降结肠共有的菌属有巨单胞菌属、双歧杆菌属、大肠-志贺氏杆菌属、韦荣氏球菌属、不动杆菌属、萨

特氏菌属、克雷伯菌属及拟杆菌属。总体来说放线菌门的双歧杆菌属和厚壁菌门中的巨单胞菌属在相对丰度上占优势。

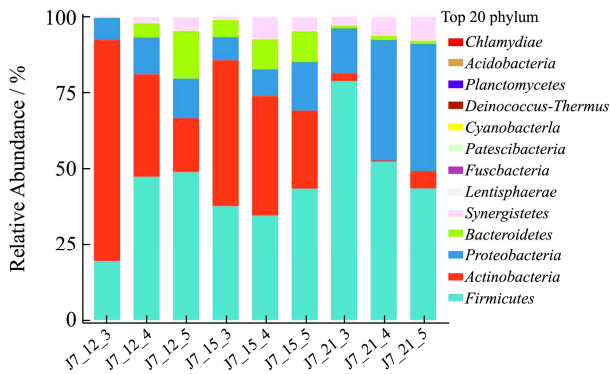


图3 门水平物种组成柱状图

Fig.3 Histogram of species composition at phylum level

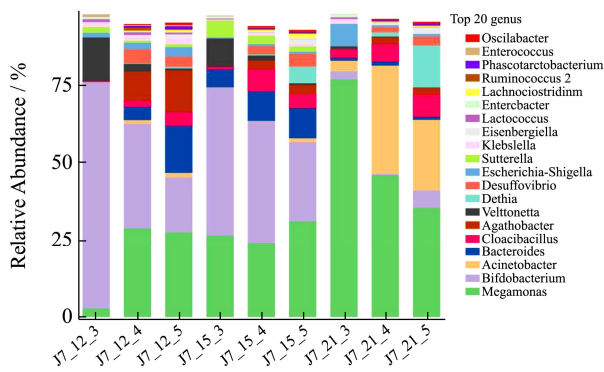


图4 属水平物种组成柱状图

Fig.4 Histogram of species composition at genus level

2.3 Alpha 多样性分析

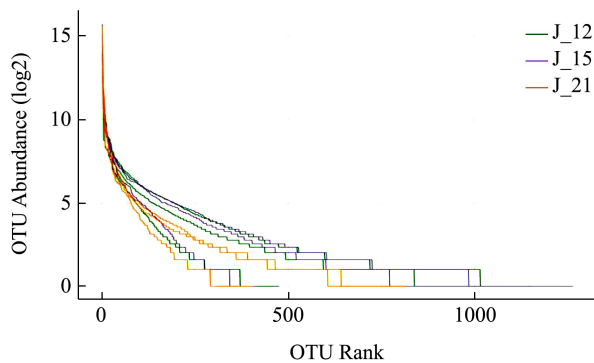


图5 稳定期、干预期和维持期的丰度等级曲线图

Fig.5 The curve of abundance grade in stable, treatment and maintenance period

丰度等级曲线可用来反应物种丰度、多样性及均匀度。在水平方向上, 曲线的宽度反映物种的丰度, 物种的丰度越高, 曲线在横轴上的范围越大; 曲线的形状(平滑程度)反映了样本中物种的均度, 曲线越平缓, 物种分布越均匀。三个时期的丰度等级曲线如图5所示, 稳定期折线较陡峭, 丰度差异较大, 均匀度较低; 干预期

折线的平缓程度较好, 群落中各 ASV/OTU 间的丰度差异较小, 群落组成的均匀度较高; 维持期的升结肠和横结肠的曲线宽度最宽, 物种丰度最高。

2.4 Beta 多样性分析

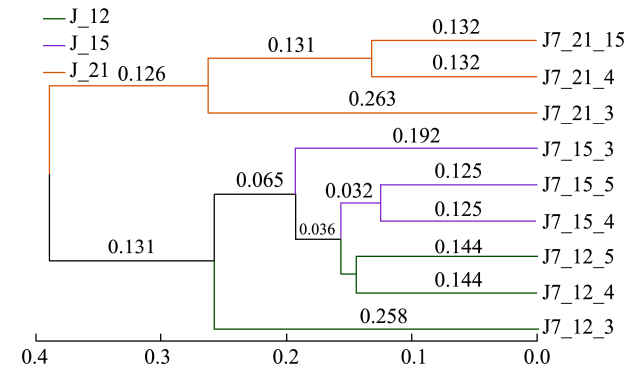


图6 距离矩阵的 Bray-Curtis distance 指数 UPGMA 聚类树

Fig.6 Bray Curtis distance index UPGMA clustering tree of distance matrix

数据以样本距离矩阵的 Bray-Curtis distance 指数采用加权的计算方法, 通过计算两个样本间各物种丰度差值的绝对值之和与其总丰度的比值, 得到 UPGMA 聚类树。样本根据彼此之间的相似度聚类, 样本间的分枝长度越短, 两样本越相似。结果如图6所示, 在三个时期中均是横结肠与降结肠相似度较高, 与升结肠相似度低, 这可能是因为食物营养液首先进入升结肠, 再进入横结肠与降结肠, 而进入横结肠与降结肠的是升结肠的发酵产物。三个时期相比差距较大, 原因是稳定期只有食物营养液在系统中发酵, 干预期中在食物营养液的基础上加入了橘皮汤, 维持期虽然恢复了食物营养液继续发酵, 但却是在干预期橘皮汤干预改变的菌群中继续发酵。

2.5 短链脂肪酸 GC 图谱分析

2.5.1 短链脂肪酸的标样色谱图

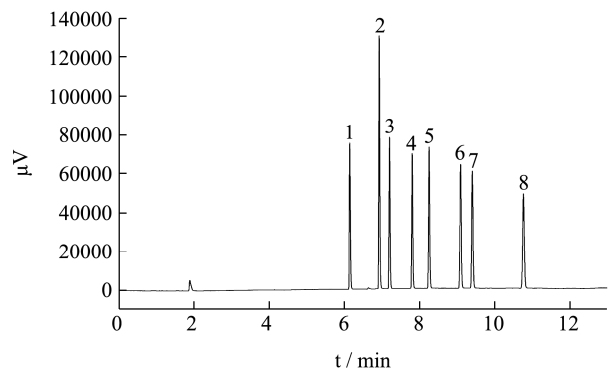


图7 短链脂肪酸混合标准品 GC 图

Fig.7 GC graph of SFACs standard

注: 1.乙酸、2.丙酸、3.异丁酸、4.丁酸、5.异戊酸、6.戊

酸、7,2-乙基丁酸、8.己酸。

图 7 为 8 个标准品的 GC 图, 由图可知, 采用 DB-FATWAX UI (30 m×0.250 mm×0.25 μm) 毛细管色谱柱, 以甲酸作为吸附占据剂可同时分离 8 种 SCFAs, 且分离效果较好。

2.5.2 消化液中短链脂肪酸色谱图

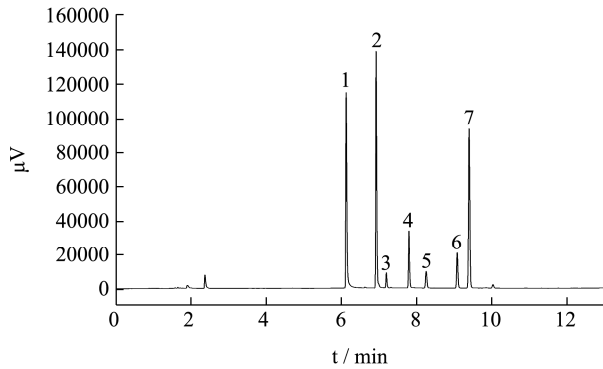


图 8 消化液样品中短链脂肪酸 GC 图

Fig.8 GC of SCFAs in digestive juice samples

注: 1.乙酸、2.丙酸、3.异丁酸、4.丁酸、5.异戊酸、6.戊酸、7.2-乙基丁酸 (内标)。

图 8 是 SHIME 系统中消化液样品短链脂肪酸 GC 图, 由图可见在本研究气相色谱条件下, 乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸、2-乙基丁酸 (内标) 可以依次得到分离, 且峰形较好; 其中乙酸、丙酸含量较多, 丁酸次之; 己酸未检测出。

2.5.3 短链脂肪酸的含量分析

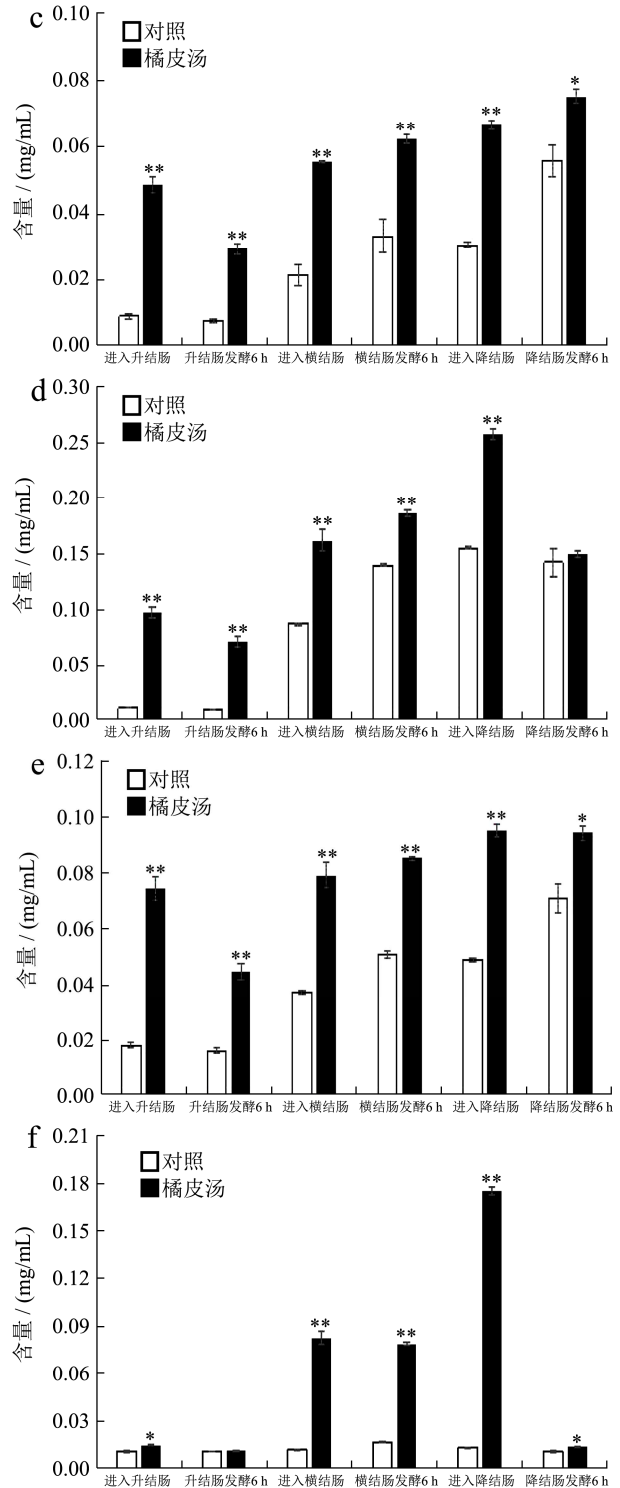
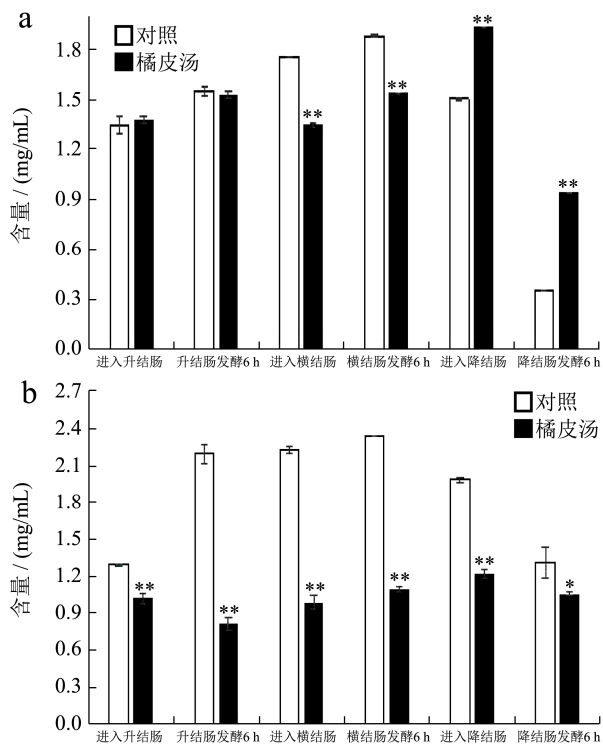


图 9 橘皮汤对短链脂肪酸的影响

Fig.9 Effect of orange peel soup on SCFAs

注: a: 乙酸; b: 丙酸; c: 异丁酸; d: 丁酸; e: 异戊酸; f: 戊酸。与对照组相比*0.01<p<0.05, **p<0.01。

橘皮汤干预后对短链脂肪酸的影响如图 9 所示。橘皮汤干预与稳定期对照比较时乙酸在升结肠阶段变化不明显, 在横结肠阶段显著减少, 在降结肠阶段显

著增多, 总体增加了 3.21%; 丙酸在升结肠、横结肠与降结肠阶段显著减少了 45.43% ($p < 0.01$); 异丁酸、丁酸和异戊酸在升结肠、横结肠与降结肠阶段显著增多 ($p < 0.01$), 分别增加 52.94%、40.86%和 48.94%; 戊酸在升结肠发酵 6 h 无显著变化, 在横结肠与进入降结肠显著增多了 80.00%。说明橘皮汤干预后改变了肠道菌群结构及丰度的变化, 相对应的改变了其代谢产物短链脂肪酸含量。

2.6 讨论

肠道菌群作为人体最大的微生态系统, 与宿主共生, 保持动态平衡, 维持正常的生理过程。其代谢产物短链脂肪酸主要包括乙酸、丙酸、丁酸, 是肠道上皮细胞的主要能量来源且能够维持肠道的酸性环境, 促进肠上皮细胞的生长与分化, 抑制病原微生物的生长。在本研究中橘皮汤干预使肠道菌群代谢产物乙酸含量先下降后上升, 丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸的含量上升, 丙酸的含量下降。乙酸是多数细菌发酵的主要代谢产物, 也是胆固醇合成的最主要底物, 在机体内, 大部分乙酸被吸收入血液, 进入肝脏的代谢, 作为周边组织的能源。乙酸的含量在干预期降结肠中升高, 可能是由于在橘皮汤干预期降结肠菌群多样性与丰度上升的缘故。丙酸是拟杆菌门发酵的主要产物, 橘皮汤干预后拟杆菌属丰度降低, 从而使丙酸含量降低, 也有研究发现丙酸主要与克雷伯氏菌呈正相关^[15], 在本研究中橘皮汤也抑制了克雷伯氏菌属的生长。丁酸主要由厚壁菌门代谢形成, 能被结肠上皮细胞吸收利用, 是结肠、盲肠能量的首选来源^[16], 厚壁菌门的巨单胞菌属在该菌群中属于优势菌种, 且经过橘皮汤干预后巨单胞菌属丰度上升。也有研究发现丁酸和变形菌门呈显著性负相关^[17], 本研究结果也显示变形菌门的克雷伯氏菌属丰度下降。短链脂肪酸的生成和消耗是个动态过程, 可以推测橘皮汤干预后, 影响了能发酵产生短链脂肪酸的菌群, 使其丰度发生变化。而以某种短链脂肪酸为能量来源的菌群增多会使短链脂肪酸减少。与稳定期相比干预期的物种属水平相对丰度提高的有巨单胞菌属、拟杆菌属, 异丁酸、异戊酸及戊酸含量的提高可能与这些菌属相关, 还可能与韦荣氏菌属、克雷伯氏菌属、大肠-志贺氏杆菌属等有害菌的减少有关, 但主要由哪些菌群代谢形成还有待研究。

中药在肠道内可以发挥“扶正祛邪的作用”, 即促进有益菌的生长, 抑制有害菌的生长。有研究证明补益类中药党参能够促进益生菌的生长和繁殖, 口服党参, 机体肠道内乳杆菌明显增加, 有害大肠杆菌明显

降低^[18]。龙承星^[19]建立小鼠肠道菌群腹泻型模型中放线菌门显著增加, 厚壁菌门显著降低, 经七味白术散治疗后放线菌门比例下降, 厚壁菌门比例上升且高于正常组。本研究结果显示橘皮汤能增加厚壁菌门的相对丰度, 减少放线菌门的相对丰度。

肠道菌群失调常导致腹泻或慢性腹泻, 若腹泻严重则出现恶心、呕吐症状。腹泻患者常服用双歧杆菌三联活菌胶囊、乳酸菌素片及乳酸菌胶囊等。乳酸菌是发酵糖类及可发酵碳水化合物产生大量乳酸, 抑制肠道内腐败细菌的繁殖, 调整肠道菌群, 改善肠道运动功能, 进而起到治疗腹泻的作用。而巨单胞菌属亦是利用各种碳水化合物产生乙酸、丙酸和乳酸^[20], 丁酸也是由厚壁菌门代谢形成, 橘皮汤干预后巨单胞菌属在维持期丰度大幅增长, 这可能与乳酸菌治疗腹泻的功能类似且与丁酸含量升高有关。克雷伯氏菌属的肺炎克雷伯氏菌增多可引起肺炎、脑膜炎、呼吸道感染、泌尿系统感染、腹膜炎、腹泻及败血症等。橘皮汤干预后有害菌克雷伯氏菌属丰度下降, 这可能也是橘皮汤能抑制腹泻的可能性之一。因此橘皮汤可能是通过促进厚壁菌门巨单胞菌属生长从而增加乙酸与丁酸含量, 且抑制变形菌门克雷伯氏菌属来达到治疗腹泻的作用。总的来说橘皮汤的作用机制与肠道微环境的改变及其代谢产物短链脂肪酸的改变密切相关。

本研究使用的粪便样品来自过去半年未使用抗生素药物的健康宿主, 对于特定群体如高脂患者、糖尿病患者、过敏人群在橘皮汤干预后肠道菌群及短链脂肪酸的变化还尚待探究。

3 结论

橘皮汤干预能起到改变肠道微生物多样性的功效, 并具有调整菌群丰度水平的作用, 表现出促进厚壁菌门巨单胞菌属生长水平, 抑制变形菌门克雷伯氏菌属及韦荣氏球菌属等肠道有害微生物的生长, 对放线菌门双歧杆菌属也有一定的抑制作用; 并对肠道菌群代谢产物短链脂肪酸的产生有一定的促进作用, 在一定程度上改善了人体肠道健康。短链脂肪酸的含量也在一定程度上反映了细菌的活性及菌群的数量。为橘皮汤治疗呕吐、呃逆、嗝气及其药食同源中药食材功能开发提供了一定的理论基础。

参考文献

- [1] Tomasello G, Bellavia M, Palumbo V D, et al. From gut micro-flora imbalance to *mycobacteria* infection: is there a relationship with chronic intestinal inflammatory diseases [J]. *Ann Ital Chir*, 2011, 82(5): 361

- [2] Morrison Douglas J, Preston Tom. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism [J]. Gut microbes, 2016, 7(3): 189-200
- [3] 马悦宁,张惠珏,刘小钰,等.橘皮汤及其变方的古今应用[J].系统医学,2018,3(10):191-192,195
MA Yue-ning, ZHANG Hui-jue, LIU Xiao-yu, et al. The ancient and modern application of orange peel soup and its modified prescriptions [J]. Systematic Medicine, 2018, 3(10): 191-192, 195
- [4] 杨志宏,刘冉冉,刘占涛,等.橘皮汤对顺铂致大鼠异嗜行为及胃肠激素的影响[J].中华中医药杂志,2015,30(9):3307-3310
YANG Zhi-hong, LIU Ran-ran, LIU Zhan-tao, et al. Effects of orange peel soup on cisplatin induced heterophilic behavior and gastrointestinal hormones in rats [J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine, 2015, 30(9): 3307-3310
- [5] 姜明旭,赵霞.针刺配合橘皮汤治愈颅脑术后顽固性呃逆[J].山东中医杂志,2002,21(1):48
JIANG Ming-xu, ZHAO Xia. Acupuncture combined with orange peel soup for intractable hiccup after craniotomy [J]. Shandong Journal of Traditional Chinese Medicine, 2002, 21(1): 48
- [6] Molly K, Vandewoestyne M, Desmet I, et al. Validation of the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME) reactor using microorganism associated activities [J]. Microb Ecol Health Dis, 1994, 7: 191-200
- [7] Sivieri K, Martha L, Morales V, et al. Prebiotic effect of fructooligosaccharide in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME Model) [J]. Med Food, 2014, 17(8): 894-901
- [8] Ana M Rovalino-Córdova, Vincenzo Fogliano, Edoardo Capuano. Effect of bean structure on microbiota utilization of plant nutrients: an *in-vitro* study using the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME®) [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 73: 104087
- [9] Wu Ueyue, Cha Ying, Huang Xinmei, et al. Protective effects of berberine on high fat-induced kidney damage by increasing serum adiponectin and promoting insulin sensitivity [J]. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2015, 8(11): 14486-14492
- [10] Lei Liu, Qing Wang, Xin Yan, et al. Vancomycin exposure caused opportunistic pathogens bloom in intestinal microbiome by simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME) [J]. Environmental Pollution, 2020, 265(Pt B): 114399
- [11] HU Jia-miao, LIN Shao-ling, ZHENG Bao-dong, et al. Short-chain fatty acids in control of energy metabolism [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2018, 58(8): 1243-1249
- [12] 邵鑫.人体胃肠道微生态消化模拟系统的构建及其稳定性评估[D].广州:暨南大学,2016:48
SHAO Xin. Construction and stability evaluation of human gastrointestinal microecological digestion simulation system [D]. Guangzhou: Jinan University, 2016: 48
- [13] WU Rui-yu, TANG Xin, KANG Xin-cong, et al. Effect of a Chinese medical nutrition therapy diet on gut microbiota and short chain fatty acids in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME) [J]. Journal of Functional Foods, 2019, 62: 103555
- [14] 吴凯旋,谢彤彤,迟明妹,等.厌氧发酵液中挥发性脂肪酸的气相色谱检测方法研究[C].《环境工程》编委会、工业建筑杂志社有限公司.《环境工程》2019年全国学术年会论文集(下册).《环境工程》编委会、工业建筑杂志社有限公司:《环境工程》编辑部,2019:458-462
WU Kai-xuan, XIE Tong-tong, CHI Ming-mei, et al. Determination of volatile fatty acids in anaerobic fermentation broth by gas chromatography [C]. Editorial board of environmental engineering, industrial construction magazine Co. Ltd. Proceedings of the 2019 national academic annual meeting of Environmental Engineering (Volume II). Editorial board of environmental engineering, industrial Construction Magazine Co. Ltd.: Editorial Department of environmental engineering, 2019: 458-462
- [15] 石梦玄,张璐,田美玲,等.基于体外模拟肠道微生态体系比较不同果蔬全粉的益生元功效[J].中国食品学报,2020, 20(2):87-94
SHI Meng-xuan, ZHANG Lu, TIAN Mei-ling, et al. Comparison of prebiotic efficacy of different fruit and vegetable whole powders based on *in vitro* simulated intestinal micro ecosystem [J]. Acta food Sinica, 2020, 20(2): 87-94
- [16] Ngoc Tuan Tran, LI Zhong-zhen, WANG Shu-qi, et al. Progress and perspectives of short-chain fatty acids in aquaculture [J]. Reviews in Aquaculture, 2020, 12(1): 283-298

(下转第 49 页)