

基于 16S rRNA 技术分析当归超微粉 对小鼠肠道菌群多样性的影响

白雪松¹, 刘鹤¹, 宋岩², 律广富³, 林贺¹, 林喆¹, 李银清¹

(1. 长春中医药大学药学院, 吉林长春 130117) (2. 长春中医药大学临床学院, 吉林长春 130117)

(3. 长春中医药大学人參科学研究院, 吉林长春 130117)

摘要: 研究不同剂量当归超微粉对小鼠肠道菌群多样性、肠道生理结构的作用。将 C57BL/6 小鼠分为当归超微粉高剂量组 (2.0 g/kg)、中剂量组 (1.0 g/kg)、低剂量组 (0.5 g/kg)、传统饮片组 (2.0 g/kg)、传统粉末组 (2.0 g/kg) 和空白组, 灌胃给药 15 d, 记录体重, 在灌喂第 15 d 时无菌取结肠内容物, 扩增肠道菌群 16S rRNA 基因的 V3+V4 区, 采用高通量测序分析 β 多样性和 α 多样性、分析门水平和属水平的物种组成, HE 染色法观察胃肠道病理变化。结果显示, C57BL/6 小鼠体重正常生长, 当归超微粉饮片高剂量组的对小鼠肠道微生物的疣微菌门 (Verrucomicrobia) 含量显著增加 ($p < 0.05$), 放线菌门 (Actinobacteria) 含量减少 ($p < 0.01$)。另外, 当归超微粉饮片中剂量组拟杆菌门 (Bacteroidetes) 含量降低最为显著, 厚壁菌门 (Firmicutes) 增加最为显著; 在属水平中剂量 *Faecalibaculum* 增加最明显 ($p < 0.05$), 故超微粉的中剂量为最佳实验剂量。各处理组小鼠胃肠道无病理变化。本实验可为当归以超微粉的使用方式, 对人体保健或治疗使用的科学用量和安全性, 提供理论依据。另外, 可为以肠道菌群相关的有效性提供技术支持。

关键词: 当归超微粉饮片; 16S rRNA; 小鼠肠道菌群; 微生物多样性

文章编号: 1673-9078(2021)04-25-32

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.4.0708

Analysis of the Effects of *Angelica sinensis* Ultrafine Powder on the Diversity of Intestinal Flora in Mice Based on 16S rRNA Technology

BAI Xue-song¹, LIU He¹, SONG Yan², LV Guang-fu³, LIN He, LIN Zhe¹, LI Yin-qing¹

(1. School of Pharmacy, Changchun University of traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

(2. School of Clinical Medicine, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

(3. Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

Abstract: The effects of different doses of ultrafine powder on the diversity of intestinal flora and physiological structure of the intestinal tract in mice were studied. C57BL/6 mice were divided into high-dose ultrafine powder group (2.0 g/kg), medium-dose group (1.0 g/kg), low-dose group (0.5 g/kg) and traditional decoction piece group (2.0 g/kg), the traditional powder group (2.0 g/kg) and the blank group, and subject to intragastric administration for 15 days. The body weights were recorded. On the 15th day of gavage, the colon contents were taken out aseptically, the V3+V4 region of the 16s rRNA gene of the intestinal flora was amplified, and the beta diversity and alpha diversity were analyzed by high-throughput sequencing. The compositions of the species at the phylum level and genus level were analyzed, and the pathological changes of the gastrointestinal tract was examined by HE staining. The results showed that the body weight of C57BL/6 mice grew normally. The high-dose of *Angelica sinensis* ultrafine powder decoction pieces significantly increased the content of *Verrucomicrobia* ($p < 0.05$) and decreased the content of *Actinobacteria* ($p < 0.01$). In addition, in the medium-dose group of *Angelica sinensis* ultrafine powder decoction

引文格式:

白雪松,刘鹤,宋岩,等.基于 16S rRNA 技术分析当归超微粉对小鼠肠道菌群多样性的影响[J].现代食品科技,2021,37(4):25-32

BAI Xue-song, LIU He, SONG Yan, et al. Analysis of the effects of *Angelica sinensis* ultrafine powder on the diversity of intestinal flora in mice based on 16S rRNA technology [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(4): 25-32

收稿日期: 2020-07-26

基金项目: 吉林省科技发展计划项目 (20190201153JC)

作者简介: 白雪松 (1993-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药药理学

通讯作者: 李银清 (1981-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 中药药理学

pieces, the content of *Bacteroidetes* decreased the most with the most significant increase of *Firmicutes*. At the genus level, the medium-dose increased the most significantly the content of *Faecalibaculum* ($p < 0.05$). Therefore, the medium dose of ultrafine powder was the most suitable experimental dose. There was no pathological change in the gastrointestinal tract of mice in each treatment group. This experiment can provide a theoretical basis for the scientific dosage and safety of *Angelica sinensis* ultrafine powder for human health care or treatment, and offer technical support for the effectiveness of the intestinal flora.

Key words: *Angelica sinensis* ultrafine powder decoction piece; 16S rRNA; mouse intestinal flora; Microbial diversity

当归 (*Angelica sinensis*) 在中国已被用作治疗营养不良和贫血的草药 2000 多年, 在欧洲和美洲也被用作营养剂^[1]和功能性食品^[2]。由于其治疗妇科疾病的优势, 被称为“女性人参”^[3]。关于当归等 6 种新增按照传统既是食品又是中药材的物质公告 (2019 年第 8 号) 也有抗血栓及改变血液流变学、对心血管系统、利胆保肝、润肠通便、增强免疫等功效^[4], 主要含有多糖类成分^[5]。随着中医药现代化飞速发展, 超微粉碎技术成为改善传统中药饮片应用的重要途径^[6]。中药材被加工成中药超微粉饮片, 即可以作为功能保健食品, 又可以作为药用, 能有效提高中药材中有效成分溶出和吸收^[7]。

现代中药是传统现代制药技术和中医药理论的结合产物, 是祖国的中医药走向国门和走向世界的载体, 中药超微粉作为药品和食品, 其应具有安全、有效、质量一致的基本属性^[8]。药物和保健食品安全性评价是其应用的首要步骤, 是应用和获得批准上市前的必要程序和重要步骤^[9]。国家药监部门始终没有准许中药粉末药材进入市场, 主要为安全性和临床用量的有效性。分析中药材的安全性主要包括四个方面, 一是中药材毒性是客观存在的, 经过超微粉碎后, 细胞壁被打破, 有效成分溶出速率提高的同时, 也增加了中药本身包含的内源性毒性物质的释放^[10]。二是细胞壁打破造成的潜在特殊成分的释放和利用, 形成新的毒性或引起不良反应^[11]。三是由于超微粉颗粒具有表面效应等, 使其对物质的吸附性较大, 中药对肠壁的黏附作用增强, 使中药粉粒增加了在肠内的停留时间, 可能会造成肠道的物理损伤^[12]。四是其释放的内源性物质, 可能会引起肠道菌群的失衡^[13]。

本研究通过药理学与分子生物学技术, 观察比较当归超微粉饮片、其粗粉饮片和传统饮片对小鼠胃肠道组织的影响, 对当归超微粉的安全性提供科学依据。基于 16s RNA 测序技术探讨当归超微粉对肠道菌群多样性及物种组成的影响, 重点分析了不同浓度当归超微粉对肠道益生菌、潜在有害菌的促进或抑制作用, 从而选择出调节肠道菌群的最佳浓度, 为当归超微粉安全应用的剂量问题打下基础。

1 材料与amp;方法

1.1 原料

当归超微粉饮片、原药材及传统粗粉由东方红(通化)生物医药有限公司提供, 长春中医药大学大学药学院生药教研室鉴定为伞形科植物当归 (*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels) 的干燥根。当归超微粉制备方法为选取伞形科植物当归的根部。春季采挖, 除去根须和泥沙, 待水分稍蒸发后, 困成小把, 上棚, 用烟火慢慢熏干, 切成片状, 制成的当归饮片。取当归饮片, 洗净, 干燥灭菌, 粉碎成细粉; 将细粉进行低温超微粉碎得破壁粉体, 混匀, 即得。雄性 C57BL/6 小鼠, 8 周龄, 18~22 g, 生产许可证号为 SCXK(吉)-2015-0005, 长春市亿斯实验动物技术有限责任公司。动物饲养于长春中医药大学医学实验动物中心, 日光灯照明, 适应性喂养 5 d 后用于实验。

1.2 实验试剂与仪器

1.2.1 实验试剂

切片石蜡, 北京索莱宝科技有限公司; Power Soil DNA 分离试剂盒, Mo Bio Laboratories 公司; RNeasy mini 试剂盒, 美国 Qiagen 公司; Trizol, 美国 Invitrogen 公司; Quant-iT™dsDNA HS 试剂盒, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 二甲苯、无水乙醇, 北京化工厂; 切片石蜡 60~62 °C、苏木素伊红(HE)染色试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司。

1.2.2 主要仪器设备

分析天平 (CP12 4S), 德国 Sartorius 公司; Sorvall Evolution RC 型高速冷冻离心机, 美国 Thermo 公司; D-1320 型无菌操作台, 东联哈尔仪器制造厂; 精密电子天平, 美国双杰兄弟有限公司; 光学显微镜 (BX 50), 日本 Olympus 公司; 石蜡切片机, 德国 Leica 公司; DW-86L490J 型-80 °C超低温冰箱, 青岛海尔集团; BT-2001 激光粒度分布析仪, 丹东百特仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 粒度的测试

采用光散射法-激光粒度分布仪测定超微粉粒度

[14], 首先清洗粒度测试仪, 使用标准粒子校正仪器。再次清洗仪器后, 加入蒸馏水作为混悬介质, 打开超声, 使用药匙缓缓加入超微粉饮片, 使其遮光率在 15.00 左右, 停止加入。保存测试结果。读取 D_{90} 值, 测试十批当归超微粉饮片样品的粒度, 计算其平均值。

1.3.2 动物分组与药物的配制

雄性 C57BL/6 小鼠 60 只, 适应性喂养, 随机分为当归超微粉饮片高剂量组 (2.0 g/kg), DA; 中剂量组 (1.0 g/kg), DB; 低剂量组 (0.5 g/kg), DC; 传统饮片组 (2.0 g/kg), DY; 和传统粉末组 (2.0 g/kg), DF; 空白组, K。当归药典规定的临床常用剂量为 2.0 g/kg, 中剂量和低剂量为临床常用量逐级减半而来。空白组给温开水, 传统饮片采用煎煮法, 粗粉组和超微粉组为开水冲泡, 混匀给药, 连续给 15 d, 每天一次, 给药体积是 20 mL/kg。在同一时间对小鼠体质量测量。

于实验的第 15 d 每组随机选取 5 只小鼠, 乙醚麻醉后, 75% 的乙醇溶液给小鼠腹部消毒, 在超净环境解剖, 取位于结肠处的内容物, 放置无菌 EP 管中, 液氮速冻后保存于 -80°C 冰箱。

1.3.3 胃肠组织病理学检查及肠道微生物多样性检测

取上述胃肠道组织, 进行病理切片, HE 染色后观察胃肠道的病理变化。取上述肠道内容物, 根据说明书, 使用 Power Soil DNA 分离试剂盒从样品中提取总 DNA。分光光度计用 260 nm 的波长测定 DNA 的浓度和纯度。总体积为 20 μL 的 PCR 扩增, 使用 10 μL KOD FX Neo 缓冲液和 0.4 μL KOD FX Neo 以及 4 μL dNTP, 每种引物 (10 μM) 和 50 ng DNA 为 1 μL 。使用 27 正向引物 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492 反向引物 5'-GGTACCTTGTACGACTT-3', 通过 PCR 扩增 16S rRNA 基因的 V3-V4 区 (95 $^{\circ}\text{C}$ 持续 5 min, 然后进行 30 个循环, 然后分别是 95 $^{\circ}\text{C}$ 持续 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 持续 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 持续 1 min/1 kb, 并在 72 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 7 min), 纯化 PCR 产物。所有 PCR 产物均用 Quant-iTTMdsDNA HS 试剂进行定量。数据库的选择, 细菌使用 16S:Silva^[15] (Release132, <http://www.arb-silva.de>), 而真菌使用 ITS:Unite^[16] (Release 8.0, <https://unite.ut.ee/>)。

采用 Illumina 测序平台进行测序, 测序结果进行 Alpha 和 Beta 多样性分析^[17]; 基于其注释结果, 可以得到各水平的物种组成信息^[18]。

1.4 统计学分析

用均值 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm\text{SD}$) 表示, 用 IBM SPSS

Statistics 20 的软件分析数据, 单因素因素方差分析组间差异, β 多样性和 α 多样性的检验方法为 Bray-Curtis 算法, $p<0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 粒度测试结果

十批当归超微粉饮片样品 D_{90} 测定结果, 粒径结果为 $21.67\pm 0.49 \mu\text{m}$ 。后续使用的为该粒度下, 符合超微粉饮片粒度标准^[19], 使用该粒径的样品进行的动物实验。

2.2 超微粉饮片对 C57BL/6 小鼠体质量的影响

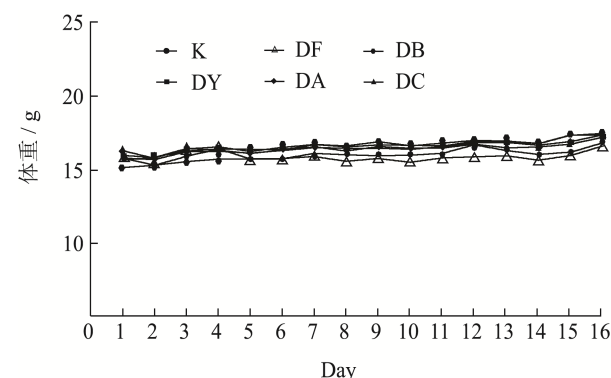


图 1 当归超微粉饮片对小鼠体质量的影响

Fig.1 Effect of ultrafine powder of *Angelica sinensis* on body weight of mice

注: 各组无明显差异。

在超微粉颗粒具有表面效应等, 使其对物质的吸附性较大, 中药对肠壁的黏附作用增强, 使中药粉粒增加了在肠内的停留时间, 可能会造成肠道的物理损伤。前人研究表明了超微粉有类似的毒性^[20]。给药期间, 小鼠的体重变化如图 1 所示。各组无明显差异, 且趋于平稳, 维持在 23 g 左右, 当归超微粉与传统饮片、传统粗粉一样, 均对 C57BL/6 小鼠体质量无显著影响。

2.3 C57BL/6 小鼠剖检与组织病理学变化

从剖检后小鼠各组织器官来看, 当归给药后各组均没有观察到任何异常和可疑病变。经 HE 病理学检查小鼠小肠、胃组织 (图 2、3), 结果显示当归超微粉各组小鼠胃粘膜无变薄、固有层也炎症浸润现象、胃部腺体形态正常; 当归超微粉各组小鼠肠道粘膜无明显病变; 肠壁下层没有显著炎症浸润现象。综上, 口服给药 15 d, 当归超微粉各组均对小鼠胃肠道无

肉眼明显损害,故常用的口服给药方式对小鼠胃肠道组织没有明显的伤害作用。可为当归以超微粉的方式

使用的安全性,提供科学依据。

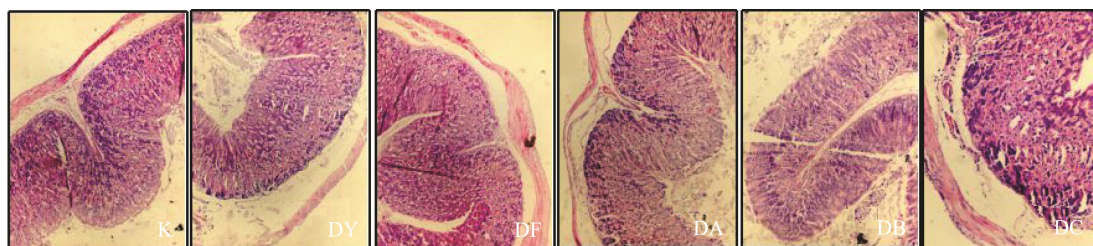


图2 当归超微粉对 C57BL/6 小鼠胃组织病理学的影响 (×100)

Fig.2 Effect of *Angelica* supermicron powder on histopathology of C57BL/6 mice stomach (×100)

注: DA: 高剂量组; DB: 中剂量组; DC: 低剂量组; DY: 当归传统饮片组; DF: 当归传统粉末组; K: 空白组。使用 Olympus 公司的倒置显微镜, 温度在 24 °C、湿度在 48% 下观察, 胃壁下层无明显炎症浸润现象。



图3 当归超微粉对 C57BL/6 小鼠肠组织病理学的影响 (×100)

Fig.3 Effect of *Angelica* supermicron powder on intestinal histopathology in C57BL/6 mice (×100)

注: DA: 高剂量组 DB: 中剂量组 DC: 低剂量组; DY: 当归传统饮片组; DF: 当归传统粉末组; K: 空白组。使用 Olympus 公司的倒置显微镜, 温度在 24 °C、湿度在 48% 下观察, 肠壁下层尚无明显炎症浸润现象。

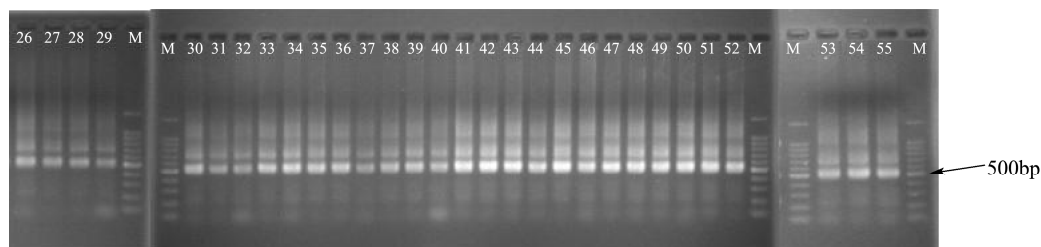


图4 C57BL/6 小鼠肠道菌群 PCR 产物电泳图

Fig.4 Electrophoresis of PCR products of intestinal microflora in C57BL/6 mice

2.4 肠道微生物多样性分析

2.4.1 小鼠肠道内容物

超微粉碎后的药材,释放的内源性物质,可能会引起肠道菌群的失衡^[21],故以小鼠实验进行论证。各处理组每组取 5 只小鼠肠道内容物基因组提取,图 4 为 PCR 扩增结果,分为第一次扩增和第二次复检。扩增条带大小为 465 bp,扩增后产物条带位置正确和清晰明亮,样品的质量全部达到了我们后续建库和测序的要求。

2.4.2 Alpha 多样性分析

Alpha 多样性 (Alpha diversity) 反映的是单个样品物种丰度及物种多样性。有 Chao1、Ace、Shannon 以及 Simpson 四种衡量指标。Chao1 和 Ace 指数评价物种数量的多少。Shannon 及 Simpson 指数评价物种

多样性。相同物种丰度的情况下,群落中各物种具有较大的均匀度,认为群落具有较大的多样性, Simpson 指数值小, Shannon 指数值大,说明样品物种多样性高^[22]。统计 OTU 覆盖率 (Coverage),发现其比率均大于 99.00% 以上,表示样本中物种被测出的概率高,未被测出的概率低,反映出了测序结果代表样本中微生物真实情况。

稀释性曲线^[23],从样本中随机抽取一些序列,统计所抽取序列代表的物种数目,以序列数和物种数构建曲线,检验出测序数据量足够反映出样品中的物种多样性,反映样品中物种的丰富程度 (图 5)。

结果表明,随着抽取数量的加大,曲线趋于平缓,表示环境中的物种并不会随测序数量的增加而明显增加,测序量足够反映样品物种多样性。等级丰度曲线^[24],是将各样品的 OTU 丰度按大小排序并基于其相

对丰度绘制的曲线图，主要用于同时解释样品所含物种的丰富度和均匀度，物种的丰富度由曲线在横轴上的长度来反映，曲线较宽，表示物种的组成足够丰富，物种组成的均匀度由曲线的形状来反映，曲线平坦，表明物种组成的均匀程度高（图6）。

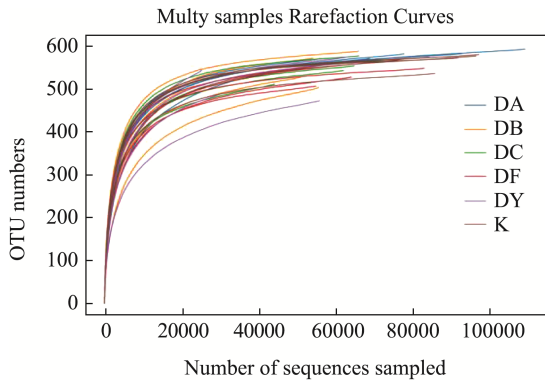


图5 C57BL/6 小鼠肠道微生物样品稀释曲线

Fig.5 Multy samples rarefaction curve of intestinal microflora in C57BL/6 mice

注：横坐标是随机抽取的测序条数，纵坐标为基于该测序条数聚类得到的 OTU 数量。

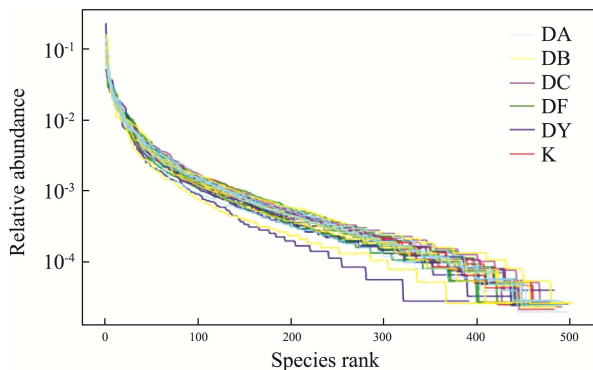


图6 C57BL/6 小鼠肠道微生物等级丰度曲线

Fig.6 Rank abundance curves of intestinal microflora in C57BL/6 mice

注：横坐标为按 OTUs 丰度排序的序号，纵坐标为对应的 OTUs 的相对丰度。

2.4.3 Beta 多样性分析

β 多样性主要分析了样本与样本间微生物群落组成的相似性。比较不同样品在物种多样性方面存在的相似程度。采用加权的方式，Bray-Curtis 算法计算样品间的距离从而获得样本间的 β 值，加权方法，需要同时考虑物种有无以及物种丰度两个问题。

主坐标分析法^[25] (Principal coordinates analysis, PCoA)，是一种与 PCA 类似的降维排序方法，通过主坐标分析可以实现多个样品的分类，进一步展示样品间物种多样性差异。在小鼠饲养第 15 d 时，空白组主成分分析显示（图 7），相聚较为紧密组间差异小，和当归给药组有明显的分界线；当归超微粉饮片等临床

剂量组，也显示出明显调节趋势；此时当归超微粉起到生物活性作用，对肠道菌群结构产生了影响，使给药组与空白组区分显著。当归传统饮片给药，对小鼠肠道菌群有明显的调节趋势，显示出独特的优势；中剂量组和低剂量组的当归超微粉介于超微粉等临床剂量组和传统饮片之间，应为超微粉应用重点关注剂量。粗粉组最为分散，无明显趋势。置换多元方差分析，它主要是用于分析多维度数据组间相似性的统计方法。可以对不同分组的样品之间 β 多样性是否显著差异进行检验。测试结果显示，各处理组，组内差异很小，组间差异都不明显，表明没有改变菌群的大体结构。

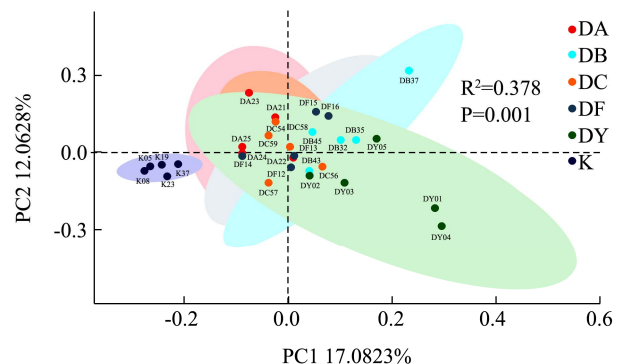


图7 C57BL/6 小鼠肠道微生物主坐标分析

Fig.7 Principal coordinates analysis of intestinal microflora in C57BL/6 mice

注：点分别表示各样品；不同颜色代表不同分组；横、纵坐标为导致样品间差异最大的两个特征值。

$R^2=0.378, p \text{ value}=0.001$

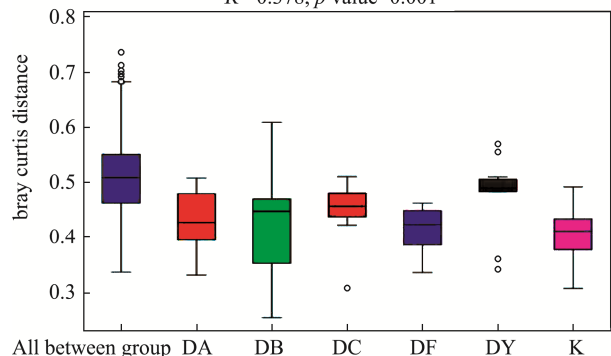


图8 小鼠肠道微生物置换多元方差分析

Fig.8 Permanova analysis of intestinal microflora in C57BL/6 mice

注：纵轴表示 Beta 距离，后面的箱型图分别是不同分组的组内样品间的 Beta 距离数据。

2.4.4 肠道微生物物种分布情况

经物种组成分析可得知各处理组在各分类水平上的分类学比对情况。组间差异显著性分析，用来发现不同组间具有统计学差异的肠道菌落。本实验采用统计学的分析方法，重点分析了门水平和属水平的。在

物种分布柱状图中，一种颜色代表一个肠道菌群的物种，色块长度代表物种所占相对含量比例。门水平所以物种，属水平显示含量前 20 的物种。并将含量低于前 20 的微生物合并为 Others 在图中显示，Unclassified 为没有进行分类学注释的微生物。

2.4.4.1 基于门水平差异性分析

经过 15 d 的各种方式处理，结果发现（由表 1 和图 9 显示），当归超微粉饮片高剂量组的疣微菌门（Verrucomicrobia）含量显著增加（ $p < 0.05$ ），放线菌门（Actinobacteria）含量减少（ $p < 0.01$ ）。另外当归超微粉饮片中剂量组拟杆菌门（Bacteroidetes）含量降低最为显著，厚壁菌门（Firmicutes）增加最为显著。其中厚壁菌门和拟杆菌门在肠道菌群中占绝对主导地位。肠道菌群和机体互相影响，互相依赖和共生，口服药物通过胃肠道，对胃肠道的作用既可以是胃肠道组织，也可以是肠道微生物。在肠道微生物的门水平，高剂量组可调节疣微菌门 Verrucomicrobia 和

Actinobacteria,二者皆为优势菌群^[26]。表明了中剂量的当归超微粉对小鼠肠道菌群有一定的调节作用，可以考虑该剂量进行日常保健应用或者临床应用，能减少药材的用量，减少药物在体内蓄积过多而产生的副作用。

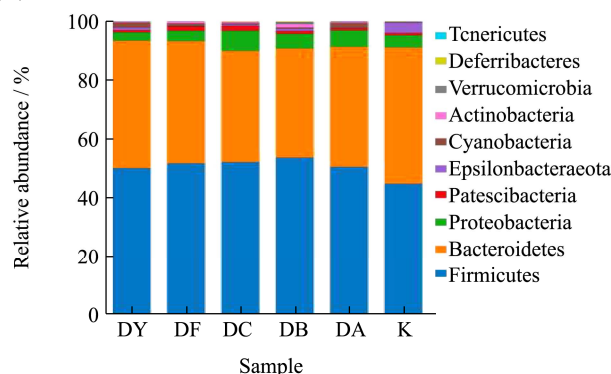


图 9 当归超微粉对小鼠肠道菌群门水平物种分布的影响

Fig.9 Effects of *Angelica* superfine powder on the distribution of intestinal phylum level in mice

表 1 当归超微粉和空白组门水平差异菌群

Table 1 Different flora of *Angelica* superfine powder and blank group

肠道菌群名称	平均值(K)	标准差(K)	平均值(DA)	标准差(DA)	p 值	变化趋势
Actinobacteria	1.75E-03	3.97E-04	4.37E-03	7.41E-04	0.0000	含量减少
Verrucomicrobia	6.30E-06	4.15E-06	2.93E-04	1.09E-04	0.0181	含量增加

注：利用 Metastats 软件对组间的物种丰度数据进行 T 检验；得到 p 值， $p < 0.05$ ，有显著性差异。

表 2 当归超微粉和空白组属水平差异菌群

Table 2 Different flora of *Angelica* superfine powder and blank group

肠道菌群名称	平均值(K)	标准差(K)	平均值(DA)	标准差(DA)	p 值	变化趋势
<i>Tyzzarella_3</i>	2.13E-04	1.30E-05	5.16E-05	2.75E-05	0.0000	含量减少
<i>GCA-900066575</i>	3.34E-03	9.31E-04	1.10E-02	1.58E-03	0.0010	含量增加
<i>Gordonibacter</i>	1.97E-05	4.09E-06	4.02E-04	1.03E-04	0.0026	含量增加
<i>Enterorhabdus</i>	1.34E-03	3.07E-04	3.15E-03	4.90E-04	0.0082	含量增加
<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>	3.81E-05	1.18E-05	9.87E-04	3.16E-04	0.0103	含量增加
<i>Coriobacteriaceae_UCG-002</i>	6.37E-05	4.44E-05	5.02E-04	1.45E-04	0.0119	含量增加
<i>Streptococcus</i>	1.35E-04	3.56E-05	1.51E-03	4.98E-04	0.0149	含量增加
<i>Faecalibaculum</i>	6.42E-04	1.67E-04	4.67E-02	1.74E-02	0.0181	含量增加

注：利用 Metastats 软件对组间的物种丰度数据进行 T 检验；得到 p 值， $p < 0.05$ ，有显著性差异。

2.4.4.2 基于属水平差异性分析

当归经过适度的微粉化能促进当归有效成分阿魏酸的溶出速率、累积溶出率和溶出总量^[27]。所以临床用量必须进行调整。临床用量调整的依据可为其传统疗效的强弱，调节肠道菌群的新疗效等。为了研究两组样品间微生物群落丰度的差异，利用 Metastats^[28] 软件对组间的物种丰度数据进行 T 检验，重点筛选出等临床剂量当归超微粉和空白组有差异的菌群结构。为 *Tyzzarella_3*、*GCA-900066575*、*Gordonibacter*、*Enterorhabdus*、*Clostridium_sensu_stricto_1*、

Coriobacteriaceae_UCG-002、*Streptococcus* 以及 *Faecalibaculum*。其中含量排在前 20 的为 *Faecalibaculum*，含量增加（ $p < 0.05$ ），其中中剂量组对小鼠肠道菌群 *Faecalibaculum* 增加最明显，可能高剂量抑制该菌落生长，低浓度有一定的促进生长的作用。另外，在对 *Dubosiella* 水平的增加有明显的增加作用，在 other 为其他物种合并显示出有明显的增加作用。在属水平高剂量主要调节 *Faecalibaculum*，肠道内 *Faecalibaculum* 可抑制肠道肿瘤生长，无其他不良副作用^[29]。另外发现，中剂量组（1.0 g/kg）对小鼠

肠道菌群的调节较为柔和, 推荐该剂量为保健用量。所以, 使用中剂量组的超微粉饮片可能最为合适, 与在门水平结果是相似的。

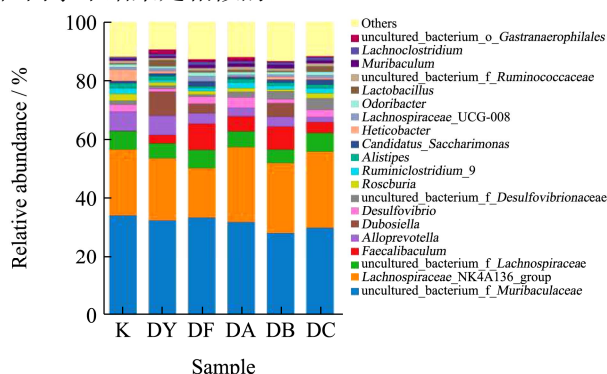


图 10 当归超微粉对小鼠肠道菌群属水平物种分布的影响

Fig.10 Effects of *Angelica* superfine powder on the distribution of intestinal genus level in mice

3 结论

当归经超微粉碎后, 破壁率大大提高, 微粉较普通粉粒度分布均匀。另外, 溶出试验表明, 由于当归超微粉碎后比表面积增大, 其成分溶出速度加快, 溶出量增加, 从而提高了中药的生物利用度和治疗效果。但并不是粒径越小越好, 粒径越小, 粒子表面会更易吸附空气和带有电荷, 影响有效成分的吸收。或者会引起相应的毒性。本次研究, 以当归超微粉饮片为研究对象, 通过药理学与分子生物学技术和基于 16s RNA 测序技术, 考察对 C57BL/6 小鼠肠道菌群、胃肠道组织的影响, 评价其安全性。为当归超微粉以保健食品或者药材饮片的方式进行应用, 提供科学的理论依据。另外, 可以找出当归超微粉口服给药对小鼠肠道菌群, 为今后当归超微粉饮片与肠道菌群相关的药效学研究提供了技术支持。针对当归超微粉对肠道菌群的研究可以为临床相关疾病的研究提供线索, 为人类的健康保驾护航。

参考文献

[1] WANG Ying, LI Xia, CHEN Xue-tao, et al. Effect of stir-frying time during *Angelica sinensis* Radix processing with wine on physicochemical, structure properties and bioactivities of polysaccharides [J]. Process Biochemistry, 2019, 81: 188-196

[2] 毛宇,徐芳,邹云,等.当归多糖对造血功能的影响及其机制的研究[J].食品研究与开发,2015,36(8):122-126

MAO Yu, XU Fang, ZOU Yun, et al. Research on the effect and mechanism of *Angelica sinensis* polysaccharide on hematopoietic function [J]. Food Research and Development,

2015, 36(8): 122-126

[3] WANG Xiao-yue, LIU Yang, WANG Li-li, et al. A nucleotide signature for the identification of *Angelicae sinensis* Radix (Danggui) and its products [J]. Entific Reports, 2016, 6(1): 34940

[4] 刘如秀,刘宇,汪艳丽,等.当归的药理作用[J].西部中医药, 2014,27(11):153-156

LIU Ru-xiu, LIU Yu, WANG Yan-li, et al. Pharmacological actions of Danggui [J]. Western Journal of Traditional Chinese Medicine, 2014, 27(11): 153-156

[5] 王艳艳,王团结,丁琳琳.响应面分析法优化当归多糖提取工艺[J].食品科学,2012,33(10):146-149

WANG Yan-yan, WANG Tuan-jie, DING Lin-lin. Optimization of polysaccharide extraction from *Angelica sinensis* using response surface methodology [J]. Food Science, 2012, 33(10): 146-149

[6] 杨艳君,邹俊波,张小飞.超微粉碎技术在中药领域的研究进展[J].中草药,2019,50(23):5887-5891

YANG Yan-jun, ZOU Jun-bo, ZHANG Xiao-fei, et al. Research progress on superfine grinding technique in field of Chinese materia medica [J]. Chinese Herbal Medicine, 2019, 50(23): 5887-5891

[7] 杨久芳,满媛,李淑艳.不同粉碎处理的葡萄籽粉强化面包抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2016,32(7):188-194

YANG Jiu-fang, MAN Yuan, LI Shu-yan, et al. The antioxidant activity of grape seeds with different pulverized treatments and their corresponding [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(7): 188-194

[8] 罗铮,邓雯,张前亮,等.基于中药 QbD 理念的当归破壁粉质量评价研究[J].中国中药杂志,2020,45(5):1105-1113

LUO Zheng, DENG Wen, ZHANG Qian-liang, et al. Quality evaluation of angelica broken wall powder based on QbD concept of traditional Chinese medicine [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2020, 45(5): 1105-1113

[9] 王婷,周刚,赵保胜.中药新药研发策略分析[J].中国新药杂志,2017,26(8):865-871

WANG Ting, ZHOU Gang, ZHAO Bao-sheng, et al. Strategy analysis of research and development of new traditional Chinese medicines [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2017, 26(8): 865-871

[10] 彭丽,唐诗韵,张美恒.当归饮片急性毒性实验研究[J].辽宁中医杂志,2019,46(2):410-412,449

PENG Li, TANG Shi-yun, ZHANG Mei-heng, et al. Experimental study on acute toxicity of *Angelica sinensis* [J]. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine, 2019,

- 46(2): 410-412, 449
- [11] 王宇红,杨蕙,莫韦皓.马钱子超微粉毒性质反应量效关系研究[J].中医杂志,2013,54(11):958-960
WANG Yu-hong, YANG Hui, MO Wei-hao, et al. Dose-effect relationship in the toxicity qualitative response of *Strychni semen* ultrafine powder [J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2013, 54(11): 958-960
- [12] 向韵,雷昌,王宇红,等.五味子超微粉、普通粉重复给药毒性作用研究[J].亚太传统医药,2017,13(16):8-13
XIANG Yun, LEI Chang, WANG Yu-hong, et al. Study on toxicity of repeated administration of *Schisandra* super powder and common powder [J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2017, 13(16): 8-13
- [13] 李伟,陈庆森.肠道黏膜免疫屏障及其菌群与机体健康关系的研究进展[J].食品科学,2008,10:649-655
LI Wei, CHEN Qing-sen. Research progress of relationship of human health with intestinal mucosal immunity and microflora [J]. Food Science, 2008, 10: 649-655
- [14] 陈继敏,欧金全,潘京.激光散射法测定普伐他汀钠原料药粒度分布[J].今日药学,2016,26(5):314-316
CHEN Ji-min, OU Jin-quan, PAN Jing, et al. Measurement of particle size distribution of pravastatin sodium by laser light scattering method [J]. Pharmacy Today, 2016, 26(5): 314-316
- [15] Quast Christian, Pruesse Elmar, Yilmaz Pelin, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools [J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(1): 590-596
- [16] Einar Ringø, Sigmund Sperstad, Olav Fjeld Kraugerud, et al. Use of 16S rRNA gene sequencing analysis to characterize culturable intestinal bacteria in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with cellulose or non-starch polysaccharides from soy [J]. Aquaculture Research, 2008, 39(10): 1087-1100
- [17] Bokulich N A, Subramanian S, Faith J J, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from illumina amplicon sequencing [J]. Nature Methods, 2012, 10(1): 57-59
- [18] 黄鑫,古文鹏,黎晓慧.基于 16S rRNA 测序对树鼩肠道菌群特征与高级别肉瘤的相关性分析[J].中国比较医学杂志, 2019,29(8):11-16,49
HUANG Xin, GU Wen-peng, LI Xiao-hui. Analysis of the correlation between the characteristics of intestinal microflora and high grade sarcoma of S rRNA tree shrews based on 16th sequencing [J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2019, 29(8): 11-16, 49
- [19] 刘亮镜,祁俊,朱和平.参术益肠超微粉体粒度分布和显微特征比较[J].现代中药研究与实践,2014,28(4):62-64
LIU Liang-jing, QI Jun, ZHU He-ping, et al. Microscopic characteristics and particle size distribution of Shenzhu Yichang ultra micro powder [J]. Research and Practice on Chinese Medicines, 2014, 28(4): 62-64
- [20] 杨泽锐,曾桂梅,彭丽华.丹参、红景天破壁饮片对正常小鼠胃肠组织影响的初步研究[J].现代中药研究与实践,2016, 30(4):28-31
YANG Ze-rui, ZENG Gui-mei, PENG Li-hua, et al. A preliminary study on the effect of *Salvia miltiorrhiza* and *Rhodiola rosea* microfine granular powde on the stomach and ileocecal organization of the normal mice [J]. Research and Practice on Chinese Medicines, 2016, 30(4): 28-31
- [21] 曾桂梅,成金乐,彭丽华.丹参破壁饮片、常规饮片及传统粉末对小鼠肠道菌群的影响[J].今日药学,2015,25(2):103-106
ZENG Gui-mei, CHENG Jin-le, PENG Li-hua, et al. Effect of radix *Salvia miltiorrhiza* cell-broken slices on intestinal flora of mice [J]. Pharmacy Today, 2015, 25(2): 103-106
- [22] Elizabeth, A, Grice. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome [J]. Science, 2009, 324(29): 1190-1192
- [23] WEN Zhi-qi, HE Ming-zhen, PENG Chun-yan, et al. Metabolomics and 16S rRNA gene sequencing analyses of changes in the intestinal flora and biomarkers induced by *Gastrodia-Uncaria* treatment in a rat model of chronic migraine [J]. Frontiers in Pharmacology, 2019, 10: 1425
- [24] Izsak J, Pavoine S. Links between the species abundance distribution and the shape of the corresponding rank abundance curve [J]. Ecological Indicators, 2012, 14(1): 1-6
- [25] Yuzhen Wang, Jimin Zheng, Hongtao Hou, et al. Effects of berberine on intestinal flora of non-alcoholic fatty liver induced by high-fat diet through 16S rRNA gene segmentation [J]. Journal of King Saud University - Science, 2020, 32(5): 2603-2609
- [26] 李梦寒,王志勇,盛雪.基于 16S rRNA 技术分析 α -乳白蛋白对大鼠肠道菌群的影响[J].食品科学,2020,41(6):155-162
LI Meng-han, WANG Zhi-yong, SHENG Xue. The effects of lactalbumin on intestinal flora α - rats by 16S rRNA technique [J]. Food Science, 2020, 41(6): 155-162

(下转第 251 页)