

# 金樱根、金樱茎多糖对小鼠肠道菌群失调的调整作用

王艳<sup>1</sup>, 张立<sup>2</sup>, 沈媛珍<sup>1</sup>, 田素英<sup>1\*</sup>

(1. 广东药学院, 广州 510006; 2. 首都儿科研究所附属儿童医院, 北京 100020)

**[摘要]** 目的: 研究金樱根、金樱茎多糖对肠道菌群失调小鼠的调整作用。方法: 用盐酸林可霉素  $15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  ig, 2 次/d, 连续 3 d, 建立小鼠肠道菌群失调模型, 用含生药  $100 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  的金樱根、金樱茎多糖进行 ig 治疗, 连续 6 d, 于第 10 天取新鲜粪便检测肠道正常菌群(肠杆菌、肠球菌、双歧杆菌和乳杆菌)的变化。CFU $\cdot \text{g}^{-1}$  粪便 = 每一稀释度平均菌落数  $\times$  稀释倍数/滴种体积 (mL)。结果用 1 g 粪便中菌数的对数表示 ( $\lg 10^{\text{n}} \cdot \text{g}^{-1}$ )。同时设正常对照、阳性对照、模型对照及自然恢复组。结果: 6 d 治疗后, 全樱根多糖组小鼠肠道主要菌群的数量基本恢复, 其中肠球菌、肠杆菌、双歧杆菌优于自然恢复组 ( $P < 0.05$ ); 金樱茎多糖组仅乳杆菌数量高于模型组 ( $P < 0.01$ )。结论: 金樱根、金樱茎多糖对正常小鼠肠道菌群失调有一定调整作用, 且金樱根多糖效果优于金樱茎多糖。

**[关键词]** 金樱根; 金樱茎; 多糖; 菌群失调

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0270-03

## Effect of Polysaccharides of Radix *Rosa laevigata* and Caulis *Rosa laevigata* on Intestinal Flora of Mouse

WANG Yan<sup>1</sup>, ZHANG Li<sup>2</sup>, SHEN Yuan-zhen<sup>1</sup>, TIAN Su-ying<sup>1\*</sup>

(1. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. The Children's Hospital Affiliated to Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China)

**[Abstract]** **Objective:** To research the effect of polysaccharides of Radix *Rosa laevigata* and Caulis *Rosa laevigata* on intestinal flora of mouse. **Method:** Intestinal microbe dysbiosis in mice were constructed by intragastric administration of lincomycin ( $15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , bid, 3 d). The mice were given polysaccharides of Radix *Rosa laevigata* and Caulis *Rosa laevigata* ( $100 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  of crude drug for 6 days,) and then normal intestinal flora of fresh fecal was taken on the 10<sup>th</sup> day to observe the changes in normal intestinal microflora in the first 10 days. The result was expressed as  $\lg 10^{\text{n}} \cdot \text{g}^{-1}$ . The normal control, positive control and spontaneous recovery groups were set up. **Result:** Intestinal microbe dysbiosis in mice was successfully established. After the intestinal microbial flora in mice was disturbed and then treatment by polysaccharides of Radix *Rosa laevigata* and Caulis *Rosa laevigata* for 6 days, alteration of intestinal flora in polysaccharides of Radix *Rosa laevigata* was basically regulated. For polysaccharides of Caulis *Rosae laevigatae*, comparing with the model groups, only the quantity of *Enterobacteriaceae* and *Bifidobacterium* was increased significantly ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The polysaccharides of Radix *Rosa laevigata* and Caulis *Rosa laevigata* have the function of regulating alteration of intestinal flora. Comparing with Caulis *Rosae laevigatae*, Radix *Rosa laevigata* has the better curative effect.

**[Key words]** Radix *Rosa laevigata*; Caulis *Rosa laevigata*; polysaccharide; intestinal microflora dysbiosis

肠道菌群与机体的健康有着密切的关系, 正常情况下, 肠道菌群与宿主间相互依赖、相互制约, 在质和量上形成一定的生态平衡<sup>[1-2]</sup>。菌群失调是正

常微生物菌群发生的定量或定性的异常变化。抗生素类药物的使用, 在杀死病原菌的同时, 也导致有益菌大量死亡, 引起肠道菌群紊乱。研究发现部分补

**[收稿日期]** 20120228(204)

**[基金项目]** 中山市健康基地专项基金(2009H020)

**[第一作者]** 王艳, 硕士, 实验师, 从事病原生物多肽的研究, Tel: 0760-88207977, E-mail: sahara81@163.com

**[通讯作者]** \* 田素英, 硕士, 高级实验师, 从事中药资源的开发利用研究, Tel: 0760-88207910, E-mail: zsxqtsy@126.com

益类中药具有扶植正常菌群生长作用,可调整菌群失调、提高定植抗力,起到益生元效果,是理想的微生态调节剂<sup>[3]</sup>。

金樱根为蔷薇科植物金樱子的干燥根,其性平,味酸、涩,归肾、脾经,主要功效为固精涩肠<sup>[4]</sup>。现代研究结果表明金樱根有耐缺氧作用、抗炎作用等<sup>[5-6]</sup>。而金樱茎常常被混杂在金樱根药材中使用。对金樱根在调整菌群失调方面的研究尚未见报道。本文通过实验研究金樱根多糖对肠道菌群失调小鼠的调整作用,同时比较金樱根与金樱茎的多糖在调节菌群失调方面的作用差异。旨在揭示金樱根涩肠止泻机制,同时为金樱茎能否混入金樱根入药提供依据。

## 1 材料

**1.1 药品和试剂** 金樱根、金樱茎药材饮片(广州致信中药饮片有限公司,批号 20110923,经广东药学院田素英副教授鉴定为金樱子 *Rosa laevigata* Michx. 的干燥根和茎);盐酸林可霉素胶囊(丽珠集团利民制药厂,按林可霉素计 0.25 g/粒,批号 20110812);丽珠肠乐(丽珠集团丽珠制药厂,0.5 亿活菌/20 粒,批号 20110715)。

**1.2 培养基** 伊红美蓝培养基(EMB,用于选择性培养肠杆菌);双歧杆菌培养基(改良 MRS),乳杆菌培养基(MC)由实验室自制,分别用于选择性培养双歧杆菌和乳杆菌;肠球菌培养基(EC,用于选择性培养肠球菌)。

**1.3 仪器设备** CS101-3ABNR 型红外线电热鼓风干燥箱(重庆永生实验仪器厂),LDZX-50FAS 型立式压力蒸气灭菌器(上海申安医疗器械厂),不锈钢手提式灭菌器(上海申安医疗器械厂),ZHJH-C1209C 型超净工作台(上海智城分析仪器制造有限公司),HPX-9162MBE 型数显电热培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂),DPX-9162B-2 型电热恒温培养箱(上海福玛实验设备有限公司)。

**1.4 动物** 昆明种小鼠 50 只,体重 17~26 g,雌雄各半。由广东省医学实验动物中心提供,合格证号 2008A004。饲养条件,温度(20±2)℃,湿度 60%±10%,每 2 d 更换 1 次垫料。正常饲养 3 d 后供试,实验前小鼠饮水、进食正常,状态良好。

**1.5 金樱根和金樱茎多糖的提取<sup>[7]</sup>** 将金樱根和茎打粉,各取 400 g 金樱子根和金樱茎粗粉,用无水乙醇与无水乙醚(1:1)混合液浸泡 12 h 脱脂,过滤,药物挥干溶媒后加入 80% 乙醇 90℃ 回流提取 2 次,每次 1.5 h,以除去低聚糖,过滤,取出药渣,挥干

溶媒。用 5 倍体积蒸馏水在 95℃ 条件下提取 2 次,每次 1.5 h,合并 2 次滤液,浓缩,药液加 80% 乙醇,放入冰箱中沉淀过夜,收集沉淀,沉淀再依次用 95% 乙醇、无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤,干燥,得金樱子根和茎粗多糖,使用 Sevag 法脱蛋白,浓缩,再次沉淀,沉淀再用无水乙醇、丙酮、乙醚洗数次,干燥得金樱子根和金樱子茎多糖,最后制成含原药材 2 g·mL<sup>-1</sup> 的多糖溶液。

## 2 方法

**2.1 建立小鼠肠道菌群失调模型** 除正常对照组外,其余小鼠用盐酸林可霉素 15 g·kg<sup>-1</sup> ig,2 次/d,连续 3 d,造成小鼠肠道菌群失调。

**2.2 动物分组及处理** 小鼠按体重均分为 6 组,分别为正常对照组(小鼠 ig 与药液等体积的生理盐水,1 次/d,第 7 天取新鲜粪便行细菌数检测);模型组(造模成功后于第 4 天取新鲜粪便行细菌数检测);自然恢复组(造模成功后让其自然恢复,于第 10 天取新鲜的粪便检测细菌数);金樱根多糖组(造模成功后 ig 金樱根多糖溶液,剂量为含生药 100 g·kg<sup>-1</sup>,1 次/d,连续 6 d,于第 10 天取新鲜粪便检测细菌数);金樱茎多糖组(造模成功后 ig 金樱茎多糖溶液,剂量、方法同金樱根多糖,阳性对照组(造模成功后,以丽珠肠乐 15 g·kg<sup>-1</sup>,ig,1 次/d 连续 6 d,于第 10 天取新鲜粪便检测细菌数),每组 10 只。

**2.3 粪便菌群检测** 于规定时间迫使小鼠排便,取一定量新鲜粪便置于带有玻璃珠的无菌小瓶内,以 1:10(W/V)比例加稀释液于小瓶内,并以此作为第一稀释度,振摇均匀,然后连续 10 倍稀释成系列稀释浓度至 10<sup>-7</sup>。选用 10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup> 2 种稀释度分别接种于 EMB,EC,MRS,MC 平板上。EMB,EC 37℃ 需氧培养 24 h,MRS,MC 37℃ 厌氧培养 72 h 后观察结果。根据菌落特征,革兰染色进行初步鉴定菌种,参照饶正华的细菌 CFU 统计方法<sup>[8]</sup>计菌落数。

CFU/粪便 = 平均菌落数 × 稀释倍数/滴种体积

结果以每 1 g 粪便中菌数的对数表示 (lg10<sup>n</sup>·g<sup>-1</sup>)<sup>[9-10]</sup>。

**2.4 统计学方法** 用 SPSS 17.0 统计软件,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 表示有统计学意义。

## 3 结果

小鼠造模后,绝大多数小鼠行动迟缓,毛色干枯,饮食下降,出现溏样便,甚至水样便。与正常组相比,造模小鼠肠道内的肠杆菌、肠球菌、乳杆菌、双

歧杆菌菌数明显下降 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 已造成小鼠肠道菌群失调。给予金樱根多糖后, 菌群有大幅度增加, 肠球菌、肠杆菌、双歧杆菌及乳杆菌基本恢复到正常水平, 特别是肠球菌、肠杆菌及乳杆菌与丽珠得乐组比已无显著差异, 肠球菌、肠杆菌、双歧

杆菌的恢复优于自然恢复组。金樱茎多糖的小鼠肠道菌群和乳杆菌虽有一定恢复, 明显高于模型组 ( $P < 0.01$ ), 但仍明显低于正常组、阳性组和自然恢复组 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 各组小鼠粪便标本菌群(肠球菌、肠杆菌、双歧杆菌、乳杆菌)检测 ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

| 组别   | 剂量/g·kg <sup>-1</sup> | 肠球菌                             | 肠杆菌                             | 双歧杆菌                          | 乳杆菌                             |
|------|-----------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| 正常对照 | -                     | 7.97 ± 0.13 <sup>2,7)</sup>     | 9.08 ± 0.17 <sup>1,7)</sup>     | 8.91 ± 0.09 <sup>2,7)</sup>   | 9.06 ± 0.10 <sup>2)</sup>       |
| 模型   | -                     | 7.40 ± 0.43                     | 8.33 ± 0.84 <sup>4,8)</sup>     | 8.32 ± 0.02 <sup>7)</sup>     | 7.27 ± 0.10 <sup>4,7)</sup>     |
| 自然恢复 | -                     | 8.07 ± 0.20 <sup>1)</sup>       | 8.95 ± 0.16 <sup>1,7)</sup>     | 8.46 ± 0.15 <sup>3,7)</sup>   | 8.84 ± 0.16 <sup>2)</sup>       |
| 金樱根  | 100                   | 8.34 ± 0.08 <sup>2,4,6)</sup>   | 10.63 ± 0.20 <sup>2,4,6)</sup>  | 8.78 ± 0.22 <sup>2,5,7)</sup> | 8.59 ± 0.14 <sup>2,6)</sup>     |
| 金樱茎  | 100                   | 6.76 ± 0.10 <sup>2,4,6,8)</sup> | 6.74 ± 0.10 <sup>2,4,6,8)</sup> | 8.35 ± 0.71                   | 7.80 ± 0.17 <sup>2,4,5,8)</sup> |
| 丽珠肠乐 | 15                    | 8.62 ± 0.14 <sup>2)</sup>       | 10.86 ± 0.05 <sup>2,4,6)</sup>  | 9.31 ± 0.17 <sup>1,3)</sup>   | 9.42 ± 0.41                     |

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与正常对照组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.01$ ;与自然恢复组比较<sup>5)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>6)</sup> $P < 0.01$ ;与丽珠肠乐组比较<sup>7)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>8)</sup> $P < 0.01$ 。

#### 4 讨论

胃肠道中各生理菌群数量在一定范围波动时, 能维持正常的生理和免疫功能, 具有对抗外籍菌定植的能力, 即定植抗力<sup>[11]</sup>, 而一旦机体内外部环境发生变化, 特别是过度应用广谱抗生素, 便会引起菌群失调<sup>[12]</sup>。实验小鼠在造模后, 出现进食量减少、活动量降低、粪便含水量增加等肠道菌群失调症状, 4 种主要肠道菌群: 肠球菌、肠杆菌、双歧杆菌及乳杆菌均明显下降, 尤其是肠杆菌、双歧杆菌和乳杆菌, 由此表明实验用小鼠菌群失调, 实验动物模型造模成功。丽珠肠乐(双歧杆菌)作为一种微生态活菌制剂, 能有效控制腹泻症状, 有效改善腹泻者的营养状况, 在调整微生态失调, 保持微生态平衡上作用占优。故本实验选用丽珠肠乐作为阳性药物。

小鼠造模成功后, 给予金樱根多糖, 实验所选 4 种主要肠道菌群基本上恢复到正常水平, 其中肠球菌、肠杆菌已超过正常组水平。肠球菌、肠杆菌和双歧杆菌数量亦超过自然恢复组水平, 说明金樱根多糖具有扶植正常菌群生长和调整菌群失调的作用。而金樱茎多糖组的乳杆菌虽有恢复, 但未能恢复到正常水平。这两者的实验结果的差异可能是由于两者的多糖含量不一样, 或者由于它们是属于同一种植物的不同部位而造成所含成分的作用差别, 这有待进一步的实验探讨。

本实验表明, 金樱根多糖对小鼠肠道菌群失调有调整作用, 可作为微生态调节剂, 用于防治肠道菌群失调。这为治疗抗生素引起的微生态失调提供了新型参考药物, 对于解决微生态调节剂的局限性问题也有重要的意义。同时, 也提醒我们在用金樱茎代替金樱根药材时, 要慎重考虑。

#### [参考文献]

[ 1 ] Raroff Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, et al. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis [ J ]. Cell, 2004, 118: 229.

[ 2 ] Stappenbeck T S, Hopper L V, Gordon J I. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells [ J ]. The National Academy of Sciences, 2002, 99(24): 15451.

[ 3 ] 李丽秋. 实验性大鼠溃疡性结肠炎菌群失调的诊断及复方树舌的治疗观察 [ J ]. 中国微生态学杂志, 2009, 21(6): 522.

[ 4 ] 中国药典. 一部 [ S ]. 2010: 附录 24.

[ 5 ] 黄贤华, 谭晓彬, 曾靖, 等. 金樱根醇提取液耐缺氧作用的研究 [ J ]. 赣南医学院学报, 2003, 23(5): 488.

[ 6 ] 王艳, 王嵩, 田素英, 等. 金樱根、茎抗炎作用的对比研究 [ J ]. 中国现代中药, 2010, 12(3): 34.

[ 7 ] 王瑞兰, 易俗, 陈康贵, 等. 金樱子果实中多糖的提取与分离纯化 [ J ]. 湘潭师范学院学报, 2003, 25(2): 77.

[ 8 ] 饶正华. 饲料中细菌 cfu 统计方法 [ J ]. 饲料博览, 2002, 10: 28.

[ 9 ] 杨景云. 医用微生态学 [ M ]. 北京: 中国医药科技出版社, 1997: 209.

[ 10 ] 蒋虹, 胡宏, 魏启欧, 等. 双歧杆菌对免疫抑制小鼠白色念珠菌感染的保护作用 [ J ]. 中国微生态学杂志, 1999, 11(2): 65.

[ 11 ] 崔冬冰, 左丽, 陈阿英, 等. 灵芝孢子粉和双歧杆菌对小鼠菌群失调的治疗作用 [ J ]. 贵阳医学院学报, 2008, 33(4): 363.

[ 12 ] 孙英姿, 王华强, 张月霞, 等. 人肠道菌群的研究现状 [ J ]. 中国误诊学杂志, 2010, 10(22): 5313.

[责任编辑 何伟]