

不同浓度茶多酚服用对小鼠肠道菌群的影响研究^{*}

于子婷

(北京实验动物研究中心, 北京 100012)

摘要:目的 研究不同浓度的茶多酚对小鼠肠道菌群的影响。方法 选取 24 只 C57BL/6 小鼠, 随机分为 4 组, 对照组 (CK, 不添加茶多酚)、低剂量茶多酚组 (LTP, 饮水中添加 0.4 g/L GTP)、中剂量茶多酚组 (MTP, 饮水中添加 0.8 g/L GTP)、高剂量茶多酚组 (TP, 饮水中添加 1.6 g/L GTP), 4 组均给予常规饲料, 茶多酚饮水每天更换一次, 连续 14 d。经 MiSeq 测序和生物信息学分析小鼠肠道微生物多样性。结果 高浓度茶多酚摄入可增加肠道菌群的多样性, 中剂量组和高剂量组中乳酸杆菌的含量明显高于低剂量和对照组 (p 值 = 0.038), 茶多酚对乳杆菌的增殖效果最为明显并且呈剂量依赖性。结论 茶多酚具有可以增加肠道微生物的多样性, 增加益生菌的比例及改变菌群组成的功能。

关键词: 肠道菌群; 茶多酚; 多样性; 乳杆菌

中图分类号: R-37 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)02-0038-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.02.007

肠道是人体消化吸收的重要场所, 也是人体最大的免疫器官, 在机体正常运作中发挥着极其重要的作用。据报道成年人的肠道中含有约 1000 多种不同类型的细菌, 肠道菌群紊乱是 2 型糖尿病、动脉硬化、肥胖症、骨质疏松、胃肠道疾病、自身免疫性疾病、肿瘤、神经系统疾病的重要诱因^[1-2], 因此保持肠道微生态的平衡对人体健康具有重要意义。

茶是世界第二大消费饮料, 茶多酚是茶叶中多酚类物质及其衍生物的总称, 主要由儿茶素、黄酮类、花青素、花白素和酚酸等物质组成^[3], 茶多酚在原发高血压、高血脂的防治中作用显著。另外, 茶多酚在消炎止泻上作用也比较明显。研究表明茶多酚可抑制很多真菌、细菌的活动。其杀菌及抑菌的种类有: 口中的黏放菌、变链菌; 消化器官中的金黄色链球菌、伤寒杆菌、大肠杆菌、螺旋菌等多类细菌; 皮肤上的白癣菌、新型隐形球酵母、发癣菌; 为人体带来多种危害的梭菌属菌^[4]。

随着肠道微生物的研究深入, 研究发现茶叶中的不能被人体消化吸收的多酚和多糖对肠道微生物的调节可能是茶叶发挥其活性主要作用的靶点之一^[5], 本研究主要研究茶叶中的茶多酚在影响宿主

的肠道微生物多样性及结构中所发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

茶多酚 (TP), 含量 $\geq 98\%$, 购于北京百奥莱博科技有限公司; 8 周龄雄性 SPF 级 C57BL/6 J 小鼠, 购于北京维通利华实验动物有限公司。

1.2 实验动物与分组

将 24 只 C57BL/6 J 小鼠在恒温、恒湿的 SPF 级动物房中适应性饲喂 1 周, 严格控制 12 h 光照/黑暗, 环境温度设定为 23℃, 期间小鼠自由进食和进水。该动物实验中所用的方法都经过北京实验动物研究中心动物伦理协会批准。1 周适应期结束后, 24 只 8 周龄 SPF 级 C57BL/6 小鼠, 随机分为 4 组, 每组 6 只: 对照组 (CK, 不添加茶多酚)、低剂量茶多酚组 (LTP, 饮水中添加 0.4 g/L GTP)、中剂量茶多酚组 (MTP, 饮水中添加 0.8 g/L GTP)、高剂量茶多酚组 (TP, 饮水中添加 1.6 g/L GTP)。4 组均给予常规饲料, 茶多酚饮水每天更换一次, 连续 14 d。

收稿日期: 2018-07-25

^{*} 基金项目: 北京市科学技术研究院 2017 年度萌芽计划 (No.201707)

作者简介: 于子婷 (1985—), 女, 硕士, 工程师, 研究方向: 生物化学与分子生物学. E-mail: zitingyonggan219@sina.com

1.3 样品采集及处理

处理 14 d 后,收集小鼠直肠中的新鲜粪便,约 150 mg,放入无菌的 EP 管中,密封,1 h 内置于 -80℃ 冰箱进行保存,所有的操作需在 1 h 内完成。

1.4 DNA 提取

DNA 提取方法参照 DNA Kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, U. S.) 试剂盒说明书。提取得到的 DNA 样品用 1%琼脂糖凝胶电泳检测和分光光度法 ($A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 光密度比) 进行质量检测。检测后,将样品于 20 ℃ 保存以备后续实验使用。

1.5 MiSeq 测序

微生物多样性检测选取细菌 16SrDNA V3-V4 区,样本送至北京奥维森基因科技有限公司,利用 Illumina Miseq PE300 高通量测序平台测序。细菌 16S rDNA V3-V4 扩增引物为 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACNNGGG TATCTAAT-3')。PCR 反应体系:12.5 μL 2× Taq PCR MasterMix, 3 μL BSA (2ng/μL), 2 μL Primer (5 μmol/L), 2 μL 模板 DNA, 和 5.5 μL ddH₂O。反应参数:95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 变性 45 s,55 ℃ 退火 50 s,72 ℃ 延伸 45 s,32 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。

1.6 生物信息学分析

通过 Illumina MiSeq 平台进行 Paired-end 测序,下机数据经过 QIIME (v1.8.0) 软件过滤、拼接、去除嵌合体,去除打分低于 20、碱基模糊、引物错配或测序长度小于 150 bp 的序列。根据 barcodes 归类各处理组序列信息聚类为用于物种分类的 OTU (Operational Taxonomic Units),OTU 相似性设置为 97%。对比 silva 数据库,得到每个 OTU 对应的物种分类信息。再利用 Mothur 软件 (version 1.31.2) 进

行 Shannon 指数分析。基于 Weighted Unifrace 距离,使用 R (v3.1.1) 软件包的 heatmap 进行聚类分析。

基于每个样本的 OTU 信息,使用 R 语言 vegan 与 ggplot2 等软件包进行数据计算 NMDS 分析和作图。基于每个样本的 OTU 信息,使用 R 语言进行 PCA 统计分析和作图。

1.7 统计方法

不同组之间的显著性差异通过进行 One way ANOVA 进行判断 (*t* 检验),利用 SPSS 19.0 软件进行以上统计学分析,*P*<0.05 则认为差异显著。

2 结果

通过对 24 个小鼠粪便样本的 16 s rRNA 基因 V3-V4 区进行测序,结果总共获得 1 253 144 条 tags 序列,平均每个样本 (52 114±41 441) 条 tags 序列,经过聚类分析共产生 391 个聚类分析单元 (OTU, operational taxonomic unit),全部样本的 Good's coverage 值均大于 99%,反映本次测序结果代表了样本中微生物的真实情况。实验结果表明:24 个样本中总共发现 9 个门,15 个纲,19 个目,32 个科,67 个属。

物种组成分析结果表明在科水平上 HTP 组, MTP, LTP 和 CK 中 Bradyrhizobiaceae (*P* = 0.02), Methylobacteriaceae (*P* = 0.02), Rhizobiaceae (*P* = 0.016), Staphylococcaceae (*P* = 0.007), Carnobacteriaceae (*P* = 0.003) 和 Rhodobacteraceae (*P*=0.000473) 存在明显差异 (见表 1)。在科水平的热图中也显示各组之间存在明显差异 (见图 1)

表 1 正常组、低剂量组、中剂量组与高剂量组在科水平上的差异比较
Table 1 Comparison of Family Level between Normal Group, Low Dose Group, Medium Dose Group and High Dose Group

科名	CK	LTP	MTP	HTP	<i>P</i> 值
Bradyrhizobiaceae	0	0	0	9.93E-06	0.02
Methylobacteriaceae	0	0	0	8.06E-06	0.02
Rhizobiaceae	6.53E-06	0	0	3.20E-05	0.016
Staphylococcaceae	6.53E-06	5.01E-06	6.56E-06	0.000273	0.007
Carnobacteriaceae	0	0	0	9.10E-05	0.003
Rhodobacteraceae	0	0	0	2.65E-05	0.0004

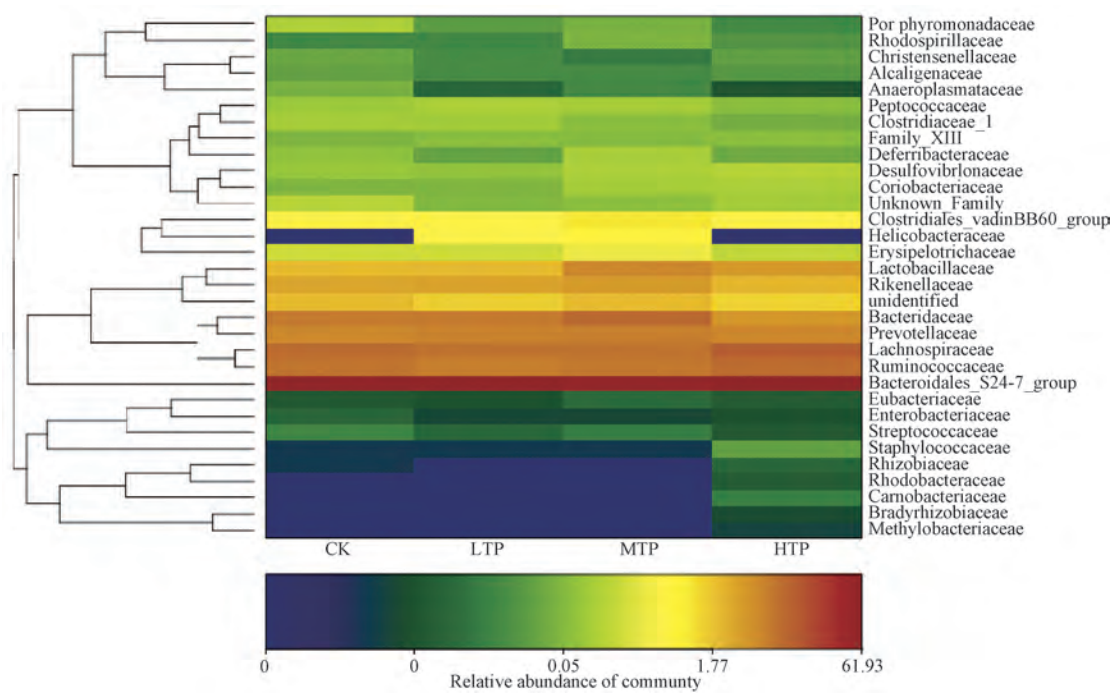


图 1 正常组、低剂量组、中剂量组与高剂量组的热图分析
Fig.1 Thermographic analysis of normal group, low dose group, medium dose group and high dose group

Anosim 相似性分析结果显示 HTP 组与 CK、LTP 和 MTP 具有显著差异 (R 值 0.7111, P 值 0.003; R 值 0.7093, P 值 0.004; R 值 0.6167, P 值 0.008) (见表 2)。shannon 值分析结果表明 HTP 组群落多样性较高 (见图 2)。

表 2 正常组、低剂量组、中剂量组与高剂量组 Anosim 相似性分析

Table 2 Anosim similarity analysis between normal group, low dose group, medium dose group and high dose group		
两两比较组别	R 值	P 值
HTP-LTP	0.7093	0.004
CK-LTP	0.05556	0.261
CK-HTP	0.7111	0.003
MTP-LTP	0.09074	0.163
MTP-HTP	0.6167	0.008
MTP-CK	0.0463	0.284

NMDS 数据分析表明 HTP 组与 CK、LTP 和 MTP 明显分离 (见图 3), 说明 HTP 组与 CK、LTP 和

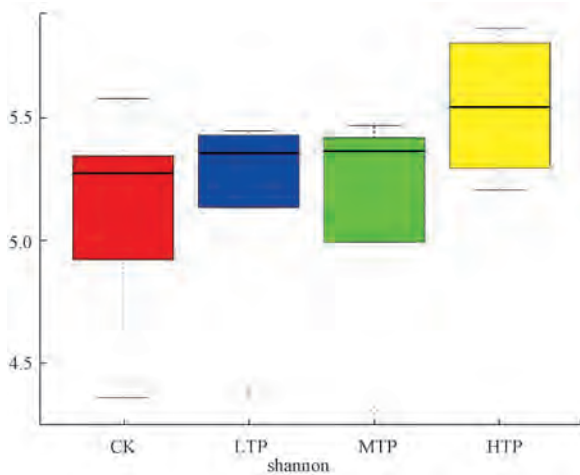


图 2 正常组、低剂量组、中剂量组与高剂量组 shannon 值分析
Fig.2 Analysis of Shannon values in normal group, low dose group, medium dose group and high dose group

MTP 组相比差异明显。PCA 数据分析也表明 HTP 组与 CK、LTP 和 MTP 明显分离 (见图 4)。

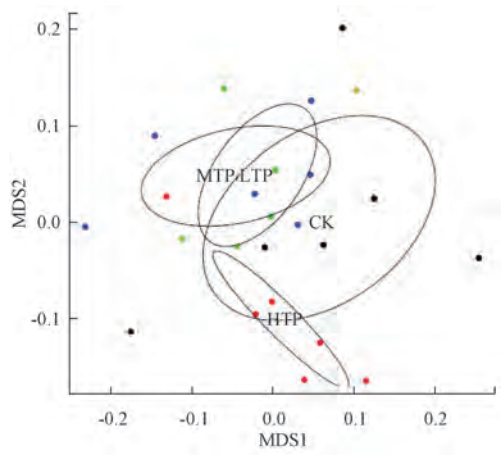


图 3 正常组、低剂量组、中剂量组与高剂量组 NMDS 数据分析

Fig.3 Analysis of NMDS data in normal group, low dose group, medium dose group and high dose group

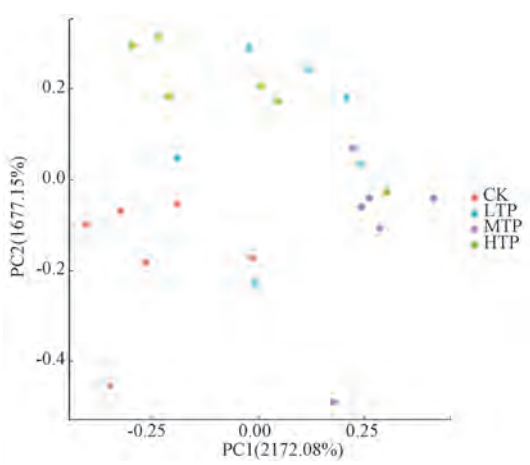


图 4 正常组、低剂量组、中剂量组与高剂量组 PCA 数据分析

Fig.4 Analysis of PCA data in normal group, low dose group, medium dose group and high dose group

3 讨论

近年来,植物多酚相关的产品保健食品、疾病预防及辅助治疗领域已经受到广泛关注^[6]。很多植物多酚进入人体消化系统后是通过与肠道微生物相互作用而被利用的,一方面微生物可以转化多酚类物质使多酚发生开环、脱甲基、脱羟基、水解、解聚还原等生化反应从而生成新的代谢产物,另一方面多酚也有类似低聚糖的益生效果,可以影响肠道微生物的结构、组成和功能^[7-8]。

本实验我们通过对 24 只饮用不同浓度的茶多酚的 C57BL/6 J 小鼠进行肠道微生物的检测,从而

来研究茶多酚对肠道微生物的影响及作用。实验中 shannon 值分析结果表明高浓度茶多酚摄入可增加肠道菌群的多样性,Anosim 相似性分析结果也显示了类似的结果。本结果与 Liu 等人利用高脂诱导的肥胖小鼠模型较绿茶、乌龙茶和红茶对高脂诱导紊乱小鼠肠道菌群影响结果一致^[9],可能由于茶多酚具有类似低聚糖的益生效果,影响了肠道微生物的多样性、结构和组成^[7]。值得注意的是茶多酚需要达到一定浓度才可以有效改变肠道微生物。

另外,本研究结果表明在中剂量组和高剂量组中乳酸杆菌的含量明显高于低剂量和对照组 ($P = 0.038$),结果与曾婷玉等利用不同剂量的茯砖茶水提取物 (15.75、31.5、63 mg/day/mouse) 对小鼠肠道中乳杆菌的影响结果相一致,并且本研究也显示茶多酚对乳杆菌的增殖效果最为明显并且呈剂量依赖性^[10]。此外,实验结果显示在 HTP 组中 Bradyrhizobiaceae, Methylobacteriaceae, Rhizobiaceae, Staphylococcaceae, Carnobacteriaceae 和 Rhodobacteraceae 含量明显升高。因而可以推测,茶多酚具有可以增加肠道微生物的多样性,增加益生菌的比例及改变菌群组成的功能。

参考文献

[1] Yano J, Yu K, Donaldson G, *et al.* Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis [J]. Cell, 2015, **161**(2): 264-276.

[2] Korem T, Zeevi D, Suez J, *et al.* Growth dynamics of gut microbiota in health and disease inferred from single metagenomicsamples[J]. Science, 2015, **349** (6252): 1101-1106.

[3] 张俊黎,王晓平.茶多酚生物学活性的研究进展[J].预防医学论坛, 2007, **13**(12): 1113- 1116.

[4] 王丽.茶多酚的生物学效应和应用机制刍议[J].福建茶叶, 2016, (3): 37-38.

[5] 屠幼英,须海荣,梁惠玲,等.紧压茶对胰酶活性和肠道有益菌的作用 [J]. 食品科学, 2002, **23**(10): 113-116.

[6] 鲁玉妙,马惠玲.我国植物多酚研究文献计量及研究热点分析 [J]. 食品科学, 2012, **33**(17): 290-296.

[7] Faria A, Fernandes I, Norberto S N, *et al.* Interplay between anthocyanins and gut microbiota[J]. Journal of Agricultural And Food Chemistry, 2014, **62**(29): 6898-6902.

[8] 杨华,叶发银,赵国华.膳食多酚与肠道微生物相互作用研究进展 [J]. 食品科学, 2015, **36**(3): 223-227.

[9] Liu Z, Chen Z, Guo H, *et al.* The modulatory effect of infusions of green tea, oolong tea, and black tea on gut microbiota in high-fat-induced obese mice [J]. Food & Function, 2016, **7**(12): 4869-4879.

[10] 曾婷玉,李恒彪,曾斌,等.茯砖茶对肠道 4 种常住微生物的影响 [J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2013, **39** (4): 387-392.

[11] 杨孝芳,崔瑾,刘小雨,等.心肌缺血损伤小型猪模型内关穴位埋针后血管新生及成纤维细胞生长因子 mRNA 和蛋白的表达[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(46):

8630-8634.

[12] 范英兰,胡丽萍,朱竟赫,等.心肌缺血动物模型实验研究进展[J].实验动物科学,2018,35(1):72-75.

Pathological Changes of Specific Myocardial Ischemia Induced by Isoproterenol in Rats Cardiomyocytes

LI Xiang¹, XIANG Shaojie², ZHAO Lei², GUAN Jingzhi³, QI Yue², MENG Li²,
DING Chunxiao², QIAO Jujiu², GAN Yu², LIU Xiaohu²

(1.Liaoning Provincial Tumor Hospital, Shenyang 110042, China)

(2. Liaoning Province Chinese Medicine Research Institute, Shenyang 110034, China)

(3.Inner Mongolia international Mongolian hospital, Hohhot 010065, China)

Abstract: Objective To observe the changes of HE staining, VEGF and FGF expression in rat myocardial tissue slices induced by subcutaneous injection of isoproterenol (1 mg/kg) in different days. **Method** Except for the natural control group, rats were injected subcutaneously with isoproterenol (1 mg/kg) 2-day group, 4-day group, 6-day group. One week after injection, the rats were anesthetized, the ECG was measured, and the heart was taken. HE staining was used to observe the changes of rat myocardial cell damage. Immunohistochemical staining was used to observe the changes of VEGF and FGF expression. **Result** Compared with the natural control group, continuous subcutaneous injection of isoproterenol (1 mg/kg) at 6-day group showed significant differences in HE staining. Expression of VEGF (vascular endothelial growth factor) and FGF (fibroblast growth factor) in the model group was also significantly different from that in the natural control group. **Conclusion** Rats were injected subcutaneously with isoproterenol (1 mg/kg) 6 days can be used as an experimental animal model for evaluating the efficacy of heterosexual cardiomyopathy.

Key words: Isoproterenol; HE staining; VEGF; FGF; Heterosexual cardiomyopathy

(上接第 41 页)

Effects of Different Concentrations of Tea Polyphenols on Intestinal Flora in Mice

YU Ziting

(BeiJing Laboratory Animal Research Center, Beijing 100012, Chian)

Abstract: Objective To study the effects of different concentrations of tea polyphenols on intestinal flora in mice. **Method** Twenty four C57BL/6 mice were randomly divided into 4 groups, control group (CK, no tea polyphenols added), low-dose tea polyphenols group (LTP, 0.4 g/L GTP added in drinking water), medium dose tea polyphenols group (MTP, 0.8 g/L GTP added in drinking water), high-dose tea polyphenols (TP, 1.6 g/L GTP added in drinking water), 4 groups are given regular feed, and tea polyphenols are replaced once a day for 14 consecutive days. Analysis of intestinal microbial diversity in mice by MiSeq sequencing and bioinformatics. **Result**

High concentration of tea polyphenols could increase the diversity of intestinal flora. The content of *Lactobacillus* in medium dose group and high dose group was significantly higher than that in low dose and control group ($P = 0.038$). **Conclusion** Tea polyphenols can increase the diversity of intestinal microorganisms, increase the proportion of probiotics and change the composition of flora.

Key words: intestinal flora; Tea polyphenol; diversity; *Lactobacillus*