

肉桂水提物对大鼠肠道梭菌属IV簇细菌和拟杆菌的影响

黄丽珠,詹宏林,王 聪,彭喜春*,张 宁,刘 柳
(暨南大学食品科学与工程系,广东广州 510632)

摘 要:目的:肉桂水提物对大鼠结肠和直肠梭菌属IV簇和拟杆菌的影响。方法:给SD大鼠灌胃一个月后分别取结肠和直肠内容物,针对肠道梭菌属IV簇和拟杆菌的16S rRNA基因应用末端限制性片段多态性分析技术对这两类菌的多样性及分布进行分析。结果:研究发现肉桂水提物能降低梭菌属IV簇细菌在结肠和直肠中的数量,增加拟杆菌属细菌在结肠和直肠中的数量;该水提物对结肠和直肠的结构均产生影响,但影响并不相同,其中对直肠的影响更大。结论:肉桂水提物对大鼠肠道菌群的这种影响可能与肉桂治疗肥胖和糖尿病有功效有关。

关键词:肉桂水提物,肠道菌群,梭菌,拟杆菌

Effect of aqueous *Cinnamomum cassia* extracts on gastrointestinal *Clostridium* cluster IV and *Bacteroides* in rats

HUANG Li-zhu, ZHAN Hong-lin, WANG Cong, PENG Xi-chun*, ZHANG Ning, LIU Liu

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

Abstract: Objective: To explore the impact of aqueous *Cinnamomum cassia* (C. cassia) extracts on gut microbiota. Methods: The colon and rectal contents were sampled after rats had been orally administrated the aqueous extracts for one month. *Clostridium* cluster IV and *Bacteroides* in the samples were analyzed by the terminal restriction fragment length polymorphism (tRFLP) method based on the bacterial 16S rRNA gene and nucleotide sequencing. Result: The aqueous C. cassia extracts could down-regulate the amount of microbiota of *Clostridium* cluster IV in rat gut, along with the increase of microbiota of *Bacteroides*. Various effects were exerted by the extracts on microbiota in colon and rectum, and the impact presented heavier in rectum. Conclusion: These variations of rat gut microbiota induced by the aqueous C. cassia extracts may reflect the functions of anti-obese and anti-dyspepsia of C. cassia.

Key words: aqueous *Cinnamomum cassia* extracts; gut microbiota; *Clostridium* cluster IV; *Bacteroides*

中图分类号: R151.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)18-0124-04

肉桂具有独特的香甜味,很早以前就被人类使用^[1]。肉桂对人体健康具有特殊功效,在我国食物烹饪中广泛使用。肉桂的水提物中含有多种不同的活性成分,如植物精油(含肉桂醛)、单宁和碳水化合物等,这些成分具有不同的生理功效,包括抗氧化、抗菌、抗炎、治疗糖尿病以及抗肿瘤的活性^[2-6]。此外,肉桂还被报道具有抗过敏、抗溃疡、退热、麻醉以及止痛的效果^[7]。其中肉桂的治疗糖尿病和肥胖的功效吸引了大量的关注,本研究拟从肉桂水提物对肠道梭菌和拟杆菌的影响反映肉桂对糖尿病和肥胖治疗效果的可能机制。人体肠道含有大量细菌(超过800种达 10^{12} 个/g粪便)^[8]。其中,梭菌属IV簇(*Clostridium* cluster IV)和拟杆菌(*Bacteroidetes*)对营养的吸收、短链脂肪酸的产生以及肠道上皮细胞的成熟和维护

具有一定的功效^[9]。本研究使用末端限制性片段多态性 (terminal restriction fragment length polymorphism, TRFLP) 技术分析大鼠肠道梭菌属IV簇和拟杆菌受肉桂水提物的影响,有助于理解肉桂对糖尿病和肥胖的治疗效果。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

肉桂 购于二天堂药店;SD大鼠 购于南方医科大学实验动物中心;FAM标记的特异性引物(见表1所示) 上海生工合成;Taq DNA聚合酶、限制性内切酶Hha I、dNTP Takara。

表1 针对16S rRNA的PCR-TRFLP引物

Table 1 PCR-TRFLP primers for 16S rRNA

目标微生物	引物	序列(5'-3')	参考文献
<i>Bacteroides</i>	32f	(FAM)AACGCTAGCTACAGGCTT	[10]
	708r	CAATCGGAGTTCTTCGTG	[10]
<i>Clostridium</i> sg-Clep-F cluster IV	sg-Clep-F	(FAM)GCACAAGCAGTGGAGT	[11]
	sg-Clep-R	CTTCCTCCGTTTGTCAA	[11]

收稿日期:2012-02-03 * 通讯联系人

作者简介:黄丽珠(1989-),女,本科,研究方向:食品质量与安全。

基金项目: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)。

RE-52型旋转蒸发仪 上海嘉鹏科技有限公司; SHZ-D(Ⅲ)型循环水式真空泵 巩义市予华仪器有限责任公司; XW-80A型旋涡混合器 江苏省海门市其林贝尔仪器制造有限公司; PL602-S型电子天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; 核酸和蛋白质测定仪 德国Eppendorf公司; TC-25/H型PCR基因扩增仪 杭州博日科技有限公司; Sub-Cell GT BASIC型电泳仪 意大利BIO-RAD公司; AmpGene Gel 3000型凝胶成像系统 北京鼎永科技有限公司; GT-163型高速离心机 北京时代永利离心机有限公司; pH计 上海精密科学仪器有限公司; THZ-98A型恒温振荡培养箱 上海一恒科技有限公司; HH-4型恒温水浴锅 江苏金坛市宏华仪器厂; YXQ-SG46-280S型不锈钢手提式压力蒸汽灭菌器 上海博迅实业有限公司医疗设备厂。

1.2 肉桂水提物的制备

将肉桂粉碎后过10目筛。称适量肉桂粉末加10倍水100℃沸水煮20min。过滤,收集滤液,备用。

1.3 动物喂饲和取样

取(200±20)g的SD大鼠,正常饮食在实验室喂饲适应一周后分成两组,每组6只。一组为空白喂饲正常饲料和饮用水,另一组在正常饮食外加喂2mL的肉桂水提取物(相当于每天摄入4g/kg BW的肉桂)。30d后,每组随机选3只鼠解剖,分别取结肠和直肠样,-20℃备用。

1.4 肠道菌群基因组DNA的提取与组化

根据粪便中细菌基因组提取试剂盒(Tiandz)说明书操作提取不同样品中的细菌基因组DNA,用凝胶电泳和紫外分光光度计检测基因组DNA的浓度、纯度以及含量。用去离子水将DNA调整为40ng/μL,分别取2μL加于PCR反应混合物中进行PCR。

1.5 PCR和酶切

PCR反应混合物如下:模板DNA20ng, Taq DNA聚合酶0.025U/μL, 1×反应缓冲液(含Mg²⁺), 引物各0.25mmol/L, dNTP 0.2mmol/L, 反应总体积50μL。PCR反应程序如下:94℃预变性3min, 94℃变性45s, 梭菌55℃、拟杆菌56℃退火30s, 72℃延伸2min, 30个循环, 72℃延伸3min。PCR产物根据New Probe PCR产物纯化试剂盒说明书进行。然后用Hha I酶切,反应体系如下:PCR产物75ng, 限制性内切酶Hha I 1U, 10×酶切缓冲液4μL(含0.4μL 20μg/mL BSA), 用去离子双蒸水补充至总体积40μL, 置于37℃酶切4h, 加热至65℃维持20min钝化酶。酶切产物送至Invitrogen公司检测末端限制性片段(Terminal restriction fragments, TRFs)。

1.6 TRFLP图谱分析

分析时,剔除小于30bp和大于600bp的TRF。根据单个TRF的峰面积除以总TRF峰面积,获得相对峰面积,忽略相对丰度小于0.5%的TRF片段。通过平行样相互比较获得可重复的片段,相邻的限制性片段小于1bp时视为相同的片段^[12-13]。

核糖核酸丰度指数(Ribotype richness, S)相当于限制性片段谱中差异片段的总数; Shannon多样性指

数(Shannon diversity index, H)和均一度指数(evenness, E)根据Mills和Falk等人的方法计算^[13-14]。Jaccard相似度指数用于评价两个样品微生物群落的相似度,根据Khafipour等人的方法计算^[15]。相似度分析(Similarity percentage, SIMPER)用于鉴定样品间对差异有贡献的片段^[16-17]。

2 结果与分析

2.1 肉桂水提物对大鼠肠道梭菌属IV簇细菌和拟杆菌的影响

经肉桂水提物处理后,SD大鼠结肠和直肠中的梭菌属IV簇的总峰面积显著降低($p < 0.01$),但拟杆菌的显著升高($p > 0.05$)(见表2)。

表2 SD大鼠结肠和直肠中梭菌属IV簇和拟杆菌的总峰面积
Table 2 Total peak areas of *Clostridium cluster IV* and *Bacteroidetes* in the colon and rectal contents of SD rat

细菌	对照样		实验样	
	结肠	直肠	结肠	直肠
梭菌属IV簇	62650	51614	23050	12044
拟杆菌属	21795	28725	24794	38080

肉桂水提取物处理后,大鼠结肠和直肠中的TRF(Hha I酶切)有所增加,但不显著($p > 0.05$), Shannon多样性指数和均一度指数表明,肉桂水提物可以提高大鼠结肠和直肠中的多样性,但并不显著($p > 0.05$)(表3)。

表3 不同样品TRFLP谱(Hha I酶切)的多样性和均一度指数

Table 3 Diversity and evenness indices for the T-RFLP profiles (Hha I digest) from the different samples

样品	S	H	E
结肠对照样	14	3.148	0.827
结肠实验样	15	3.288	0.842
直肠对照样	11	2.945	0.851
直肠实验样	12	2.988	0.833

注:S:核糖核酸丰度, S=TRFLP谱(Hha I酶切)的总条带数; H: Shannon多样性指数, $H = -\sum (p_i) (\log_2 p_i)$, p_i 指单一片段的峰面积, $H_{\max} = \log_2 S$; E: 均一度指数, $E = H/H_{\max}$; 表4同。

对梭菌和拟杆菌的Shannon多样性指数和均一度指数分别计算表明,肉桂水提物显著降低结肠和直肠梭菌的多样性($p < 0.01$),也降低拟杆菌在直肠中的多样性($p < 0.05$),但结肠中拟杆菌的多样性未发生显著变化($p > 0.05$)(见表4)。

表4 不同样品中梭菌IV簇和拟杆菌TRFLP谱(Hha I酶切)的多样性和均一度指数

Table 4 Diversity and evenness indices for the T-RFLP profiles (Hha I digest) of *Clostridium cluster IV* and *Bacteroidetes* from the different samples

细菌	样品	S	H	E
梭菌属IV簇	结肠对照样	6	2.132	0.825
	结肠实验样	5	1.478	0.637
	直肠对照样	5	2.013	0.867
	直肠实验样	4	1.448	0.724
拟杆菌属	结肠对照样	6	1.747	0.676
	结肠实验样	6	1.741	0.673
	直肠对照样	4	1.506	0.753
	直肠实验样	5	1.392	0.599

Jaccard相似度批数表明,肉桂水提取物处理后结肠中梭菌属IV簇和拟杆菌属细菌结构的相似度非常低,但直肠中更低(见表5)。

表5 结肠和直肠样品TRFLP谱中细菌群落结构的相似度
Table 5 Multiple-incidence-based similarities of gut bacterial communities between sample C and T calculated from TRFLP incidence profiles of colon and rectal samples

细菌	肉桂精油处理后肠道菌群的相似度(%)	
	结肠样品	直肠样品
梭菌属IV簇	37.37	23.29
拟杆菌属	34.68	32.73

注:基于Jaccard指数的相似度。

2.2 肉桂水提取物对大鼠肠道梭菌属IV簇细菌中各种菌的影响

从图1可以看出,肉桂水提取物对两个样品产生了不同的影响,其中仅172bp在结肠和直肠样中丰度极显著增加($p<0.01$),而66bp的丰度仅在直肠中增加显著($p<0.05$),在结肠中增加,但并不显著($p>0.05$),其余片段的丰度均不同程度地减少,尤其直肠样中175bp在处理后的丰度极显著降低($p<0.01$)。另外,据SIMPER分析表明,对照样和实验样的总TRF差异主要来自于172bp片段(见表6)。

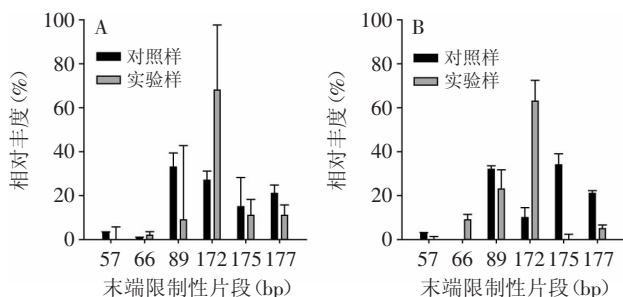


图1 肉桂水提取物处理后大鼠结肠(A)和直肠(B)中梭菌属IV簇细菌末端限制性片段(*Hha* I 酶切)和相对丰度(%)

Fig.1 Terminal restriction fragments (*Hha* I digest) and mean relative abundance (%) of *Clostridium* cluster IV in the colon (A) and rectal (B) contents of mice treated with water extracts

2.3 肉桂水提取物对大鼠肠道拟杆菌属细菌的影响

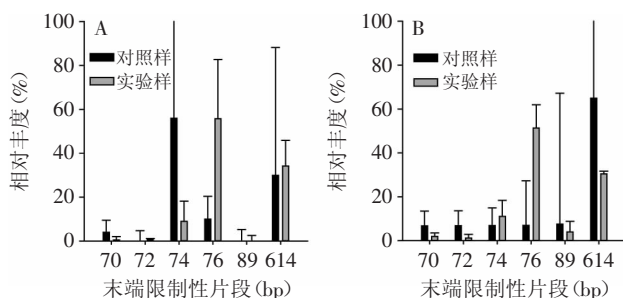


图2 肉桂水提取物处理后大鼠结肠(A)和直肠(B)中拟杆菌属细菌末端限制性片段(*Hha* I 酶切)和相对丰度(%)

Fig.2 Terminal restriction fragments (*Hha* I) and Mean relative abundance (%) of *Bacteroidetes* in the colon and rectal contents of mice treated with water extracts

从图2可以看出,直肠中拟杆菌74bp的TRF丰度远低于结肠,而614bp的TRF丰度则相反,但处理后

两者的丰度趋于近似,结肠中的74bp片段丰度降低极显著($p<0.01$);但结肠和直肠中76bp片段在处理后的,均增加极显著($p<0.01$);结肠和直肠中70、72、89bp均在处理后的变化并不显著($p>0.05$)。根据SIMPER分析(见表6所示),实验样和对照样中结肠和直肠中的梭菌属IV簇细菌的总TRF差异均主要来自于172bp;而结肠拟杆菌的总TRF差异来自于76、614bp,但直肠的来自于74、76bp。

表6 样品间TRFLP谱的SIMPER分析

Table 6 Results of SIMPER analysis of TRFLP profiles of different samples

细菌	TRF片段 (bp)	MRA (%)		FC (%)	MRA (%)		FC (%)
		C ₁	T ₁		C ₂	T ₂	
梭菌属IV簇	89	33	23	11	-	-	-
	172	27	68	44	10	63	43
	175	15	0	16	34	0	27
	177	21	5	17	21	5	13
拟杆菌属	74	7	11	-	56	9	47
	76	7	51	46	10	56	45
	614	65	30	36	30	34	-

注:MRA:各片段占总片段百分数作为该片段的平均相对丰度;FC:对照样与实验样中各差异片段数占总差异片段数的百分数(仅列出>10%的数据);“-”:样品间的FC<10%。

3 讨论

肉桂中的植物化学物质(包括肉桂醇、反式肉桂酸、丁香酚和水杨醛)在体外对五种肠道菌具有抑制效果,这五种肠道菌分别是产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)、分叉双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)、长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)和嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)。其中抑制效果最为明显的是产气荚膜梭菌和脆弱拟杆菌^[18]。本文研究了肉桂水提取物在体内能降低大鼠肠道梭菌属IV簇和拟杆菌属的细菌数量,但对这两类菌的多样性未产生显著改变,肉桂水提取物能抑制某些细菌的生长但亦能促进某些细菌的生长,这一结果与前人的报道吻合。

肉桂水提取物对肠道结肠和直肠菌群的影响有一定的差异,其中对直肠菌的影响更大,其原因可能存在于两方面:其一,植物化学物质能抑制一些肠道菌并促进另外一些肠道菌的生长^[8],结肠和直肠菌群的结构差异导致肉桂水提取物在大鼠结肠和直肠影响的差异;其次,植物化学物质如植物多酚或植物黄酮受肠道菌转化后会改变生物活性,其转化产物对肠道菌会产生影响^[19-20]。因此,肉桂中的植物化学物质(如多酚和黄酮)可能受结肠菌转化作用,其产物导致直肠菌受到更大的影响。

Turnbaugh等^[21]的研究发现,肥胖和糖尿病患者肠道厚壁菌门细菌(95%是梭菌属)比例增加,而拟杆菌的比例下降。本研究发现,肉桂水提取物对梭菌属IV簇细菌的影响要大于拟杆菌,这可能是肉桂治疗肥胖和糖尿病的机制之一。

此外,经肉桂水提取物处理后,一些受主要影响的片段所指示的细菌对健康的作用值得深入的研究,

比如梭菌的172bp、拟杆菌的74、76、614bp。

4 结论

本文研究了肉桂水提物对大鼠结肠和直肠梭菌属IV簇和拟杆菌属细菌的影响。研究发现,肉桂水提物能降低这两类菌在结肠和直肠中的总量,但影响并不相同,其中对直肠的影响更大。肉桂水提物对大鼠肠道菌群的这种影响可能与肉桂具有治疗肥胖和糖尿病的功效有关。

参考文献

- [1] Lee R, Balick MJ. Sweet wood-cinnamon and its importance as a spice and medicine[J]. *Explore*(NY), 2005, 1(1): 61-64.
- [2] Lee JS, Jeon SM, Park EM, et al. Cinnamate supplementation enhances hepatic lipid metabolism and antioxidant defense systems in high cholesterol-fed rats[J]. *J Med Food*, 2003, 6(3): 183-191.
- [3] Marsh TL. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products[J]. *Curr Opin Microbiol*, 1999, 2(3): 323-327.
- [4] Matan N, Rimkeeree H, Mawson AJ, et al. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions[J]. *Int J Food Microbiol*, 2006, 107(2): 180-185.
- [5] Youn HS, Lee JK, Choi YJ, et al. Cinnamaldehyde suppresses toll-like receptor 4 activation mediated through the inhibition of receptor oligomerization[J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 75(2): 494-502.
- [6] Couturier K, Batandier C, Awada M, et al. Cinnamon improves insulin sensitivity and alters the body composition in an animal model of the metabolic syndrome[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2010, 501(1): 158-161.
- [7] Kwon HK, Hwang JS, So JS, et al. Cinnamon extract induces tumor cell death through inhibition of NF κ B and AP1[J]. *BMC Cancer*, 2010(10): 392-401.
- [8] Wang R, Wang RJ, Yang B. Extraction of essential oils from five cinnamon leaves and identification of their volatile compound compositions[J]. *Innov Food Sci Emerg*, 2009, 10(2): 289-292.
- [9] Laparra JM, Sanz Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals[J]. *Pharmacol Res*, 2010, 61(3): 219-225.
- [10] Woodmansey EJ. Intestinal bacteria and ageing[J]. *J Appl Microbiol*, 2007, 102: 1178-1186.
- [11] Bernhard AE, Field KG. A PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in Bacteroides-Prevotella genes encoding 16S rRNA[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(10): 4571-4574.
- [12] Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, et al. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 7220-7228.
- [13] Dunbar JM, Ticknor LO, Kuske CR. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 190-197.
- [14] Mills DK, Fitzgerald K, Litchfield CD, et al. A comparison of DNA profiling techniques for monitoring nutrient impact on microbial community composition during bioremediation of petroleum-contaminated soils[J]. *J Microbiol Methods*, 2003(4): 57-74.
- [15] Falk MW, Song KG, Matias MG, et al. Microbial community dynamics in replicate membrane bioreactors-natural reproducible fluctuations[J]. *Water Res*, 2009, 43: 842-852.
- [16] Khafipour E, Li S, Plaizier JC, et al. Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75: 7115-7124.
- [17] Clarke KR, Warwick RM. Change in Marine Communities: An Approach to Statistical Analysis and Interpretation[M]. 2nd Ed. PRIMER-E, Plymouth Marine Laboratory, Plymouth, UK, 2001: 172.
- [18] Rees GN, Baldwin DS, Watson GO, et al. Ordination and significance testing of microbial community composition derived from terminal restriction fragment length polymorphisms: application of multivariate statistics[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2004, 86: 339-347.
- [19] Lee HS, Ahn YJ. Growth-Inhibiting Effects of Cinnamomum cassia bark-derived materials on human intestinal bacteria[J]. *J Agri Food Chem*, 1998, 46(1): 8-12.
- [20] Spencer JPE. Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract[J]. *J Nutr(supplement)*, 2003: 3255s-3261s.
- [21] Lee HC, Jenner AM, Low CS. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota[J]. *Res Microbiol*, 2006, 157(9): 876-884.
- [22] Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins[J]. *Nature*, 2009, 457: 480-485.

(上接第123页)

(5-6): 71-72.

[8] 白宝璋, 靳占忠, 李存东. 植物生理学实验教程下[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2001: 61-62.

[9] 侯典云, 赵盼盼, 马占强. 锰处理对小麦种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 河南农业科学, 2011, 40(7): 38-40.

[10] 吴友根, 黎庆培, 陈祥伟. 不同浓度的Ca²⁺浸种对黄瓜种子萌发的影响[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2005, 23(3): 257-260.

[11] 马崇坚. 不同化学试剂处理对茄子种子萌发的影响[J]. 种子, 2005, 24(10): 30-35.