

# 决明子蒽醌类提取物对肥胖小鼠肠道菌群的影响

刘智峰, 陈焱, 马婷, 马佳, 刘璇, 田甜, 常越\*

宁夏医科大学, 宁夏 银川

收稿日期: 2022年4月23日; 录用日期: 2022年5月17日; 发布日期: 2022年5月24日

## 摘要

目的: 观察决明子提取物蒽醌类化合物对高脂饮食诱导的肥胖小鼠肠道菌群的影响。方法: ICR小鼠40只随机分为5组, 即正常组、模型组、决明子正常剂量组、决明子低剂量组和决明子高剂量组。正常组给予生理盐水灌胃, 其他组灌胃决明子蒽醌类提取物, 四周后观察变化。生化法检测甘油三酯、总胆固醇、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白; 收集粪便提取DNA, 采用荧光定量PCR法观察肠道菌群变化。结果: 与正常对照组相比, 高脂模型组的甘油三酯水平显著升高( $P < 0.01$ ), HDL, LDL水平有所升高但未见明显变化; 双歧杆菌, 乳酸杆菌的数量降低( $P < 0.05$ ), 金黄色葡萄球菌和阴沟肠杆菌的数量升高( $P < 0.05$ )。与高脂模型组相比, 决明子蒽醌类物质药物干预组的TG水平明显下降( $P < 0.05$ ), TC, HDL水平有所升高( $P < 0.05$ ), LDL水平未见明显变化; 双歧杆菌, 乳酸杆菌的数量均出现了明显的升高( $P < 0.05$ ), 而金黄色葡萄球菌和阴沟肠杆菌的数量也有明显下降( $P < 0.05$ )。结论: 决明子蒽醌类物质治疗肥胖有一定的效果, 其干预肥胖的药效机制可能与肠道中的双歧杆菌, 乳酸杆菌的数量增加及金黄色葡萄球菌, 阴沟肠杆菌的数量降低有关。

## 关键词

决明子, 肥胖, 肠道菌群

## Effects of Anthraquinone Extracts from Semen Cassiae on Intestinal Microflora of Obese Mice

Zhifeng Liu, Han Chen, Ting Ma, Jia Ma, Xuan Liu, Tian Tian, Yue Chang\*

Ningxia Medical University, Yinchuan Ningxia

Received: Apr. 23<sup>rd</sup>, 2022; accepted: May 17<sup>th</sup>, 2022; published: May 24<sup>th</sup>, 2022

\*通讯作者。

文章引用: 刘智峰, 陈焱, 马婷, 马佳, 刘璇, 田甜, 常越. 决明子蒽醌类提取物对肥胖小鼠肠道菌群的影响[J]. 临床医学进展, 2022, 12(5): 4422-4427. DOI: 10.12677/acm.2022.125640

## Abstract

**Objective:** To observe the effects of anthraquinones extracted from cassia seed on intestinal microflora of obese mice induced by high fat diet. **Methods:** 40 ICR mice were randomly divided into 5 groups, namely normal group, model group, normal dose group, low dose group and high dose group of Cassia. The normal group was given normal saline intragastric administration, and the other groups were given anthraquinone extract of semen cassiae intragastric administration. The changes were observed after four weeks. Triglyceride, total cholesterol, high density lipoprotein and low density lipoprotein were detected by biochemical method. Feces were collected to extract DNA, and the changes of intestinal flora were observed by fluorescence quantitative PCR. **Results:** Compared with the normal control group, triglyceride levels in the high-fat model group were significantly higher ( $P < 0.01$ ), HDL and LDL levels increased but no significant changes were observed; The number of bifidobacterium and lactobacillus decreased ( $P < 0.05$ ), *Staphylococcus aureus* and *Enterobacter cloacae* increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the high-fat model group, the level of TG in the cassia anthraquinone drug intervention group significantly decreased ( $P < 0.05$ ), TC and HDL levels increased ( $P < 0.05$ ), there was no significant change in LDL level; The number of bifidobacterium and lactobacillus increased significantly ( $P < 0.05$ ), while the number of *Staphylococcus aureus* and *Enterobacter cloacae* also decreased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The anthraquinones of cassia seed have certain effect on the treatment of obesity, and its pharmacodynamic mechanism may be related to the increase of the number of bifidobacterium and lactobacillus in intestinal tract and the decrease of the number of *Staphylococcus aureus* and *Enterobacter cloacae*.

## Keywords

Cassia Seed, Obesity, Intestinal Flora

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

肥胖,一种慢性代谢性疾病,会增加心脑血管疾病、癌症、糖尿病等患病风险。根据2020出台的《中国居民营养与慢性病状况报告》显示,我国肥胖问题日益严重,亟需公众关注与解决。随着近年来对肠道菌群的研究不断深入,目前认为,肥胖的发病涉及遗传、饮食、肠道菌群等因素。在宿主菌与宿主相互作用过程中,肠道菌群可能是肥胖的出发点之一。有关研究发现,决明子具有较好的治疗肥胖的作用[1]。但是否会改善宿主肠道菌群的菌属数量和结构从而起到治疗作用仍不清楚。本研究以肠道菌群为切入点,利用实时荧光定量PCR技术,观察决明子提取物对肥胖小鼠肠道主要条件菌群结构和数量的影响,从肠道菌群角度探讨决明子的药效机制。

## 2. 材料

实验用ICR小鼠均有宁夏医科大学实验动物中心提供,动物使用许可证号:SCXK(宁)2015-0001。实验设备全自动生化分析仪,恒温低速离心机,液体快速混合器,实时荧光定量PCR仪由宁夏医科大学基础医学院实验平台提供。常规市售决明子,粪便DNA提取试剂盒,荧光定量PCR检测试剂盒,血脂检测试剂盒购自康为世纪有限公司,PCR引物委托生工合成。

### 3. 实验方法

#### 3.1. 决明子提取物蒽醌类化合物的制备

称取适量决明子粉末加入蒸馏水中, 调整 PH = 4.8 并加入适量的纤维素酶(0.6%, 10 U/mg), 在 50℃ 酶解, 经过 2 h 后在 80℃ 灭酶、过滤, 在滤液中加硫酸回流水解, 水解后冷却至室温, 用石油醚萃取四次, 合并萃取液, 回收石油醚, 往萃取液中加入 5% NaOH-2% NH<sub>4</sub>OH 混合溶液, 定容后静置, 得到成品[1]。

#### 3.2. 小鼠肥胖模型的建立

将 40 只小鼠先随机分为两组为正常饲料喂养组 8 只和高脂饲料喂养组 32 只, 高脂饲料使用 15% 猪油, 10% 蔗糖, 5% 蛋黄粉, 70% 常规饲料来喂养四周。四周后评估小鼠造模是否成功, 评估的标准是使用肥胖度来评价(肥胖度%) = (试验组实际体重 - 对照组平均体重)/对照组平均体重 × 100)。

#### 3.3. 分组及干预

按照肥胖度公式计算后, 造模成功的肥胖小鼠为 24 只, 随机分为四组, 每组 6 只。以小鼠正常服用决明子的最大剂量为 2.25 g/kg, 以此作为中剂量组, 分别扩大 5 倍和缩小 5 倍作为高、低剂量组。另外一组为空白对照组。根据中国药典中决明子用量为 10~15 g 以人与动物体表面积换算折算算法为依据得到的小鼠服用剂量检测指标作为中剂量组。灌胃四周后, 将所有小鼠称重后处死, 收集小鼠血液, 粪便和大肠与小肠进行相关检测。

#### 3.4. 检测指标

血脂指标: 甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL), 购买血脂检测试剂盒应用全自动血生化分析仪检测; 肠道菌群: 乳酸杆菌、双歧杆菌、金黄色葡萄球菌, 阴沟肠杆菌, 合成相应细菌引物应用 RT-PCR 检测菌属丰度。

#### 3.5. 粪便样本细菌基因组 DNA 的提取与 RT-PCR 检测

对粪便样本洗涤, 洗涤后的样本依照细菌 DNA 提取试剂盒中的操作步骤进行提取 DNA, 提取成功后的 DNA 使用分光光度计测量浓度, 满足提取浓度后置于 -20℃ 备用。将待测粪便样品中提取的 DNA 分别进行 4 种细菌 16SrDNA 荧光定量 PCR 反应, 反应体系和反应条件见表 1。每次实验同时设标准品校正和 ddH<sub>2</sub>O 代替 DNA 模板的阴性对照, 每个样品均同时做 3 个平行复孔。反应完毕后根据总菌的 Ct 值为参照, 计算某一种细菌占总菌的相对含量[2]。

Table 1. Primer sequences and annealing temperature

表 1. 引物序列及退火温度

名称	序列	退火温度
细菌通用引物	EUB338: ACTCCTACGGGAGGCAGCAG EUB518: ATTACCGCGGCTGCTGG	53℃
Lactobacillus	F: AGCAGTAGGGAATCTTCCA R: CACCGCTACACATGGAG	55℃
Bifidobacterium	F: CCAGTATCAACTGCAATTTTA R: GGTGTTCTTCCCGATATCTACA	55℃
Staphylococcus aureus	F: GCGATTGATGGTGATACGGTT R: A GCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	55℃

### 3.6. 数据统计及分析

样品定量数据导入 SPSS 统计软件进行分析。计量资料结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 应用方差齐性检验比较组间差异。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 4. 结果

### 4.1. 不同药物浓度各组小鼠血清 TG, TC, HDL, LDL 的变化

与正常组相比: 模型组动物血清 TG 水平显著升高( $P < 0.05$ ), HDL, LDL 水平有所升高但未见明显变化, TC 水平有所下降但也不明显。与模型组相比, 决明子药物干预组的 TG 水平明显下降, 尤其以决明子高剂量组下降最为明显( $P < 0.01$ ); TC, HDL 水平有所升高, 尤以决明子高剂量组升高最为明显( $P < 0.05$ ); LDL 水平未见明显变化。见表 2。

**Table 2.** Changes in TG, TC, HDL and LDL values in different groups of mice ( $\bar{X} \pm S, n = 6$ )

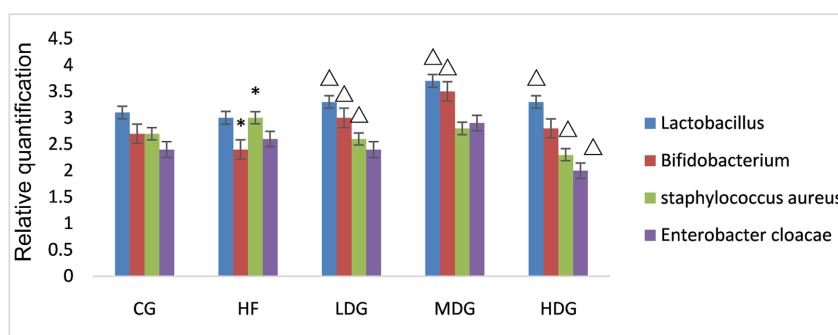
**表 2.** 不同组别小鼠 TG、TC、HDL、LDL 值的变化( $\bar{X} \pm S, n = 6$ )

组别	TG	TC	HDL	LDL
正常	1.06 ± 0.30	3.48 ± 0.43	1.68 ± 0.21	0.33 ± 0.09
模型	1.90 ± 0.30*	3.43 ± 0.17	1.71 ± 0.06	0.34 ± 0.06
决明子低剂量	0.99 ± 0.27 <sup>△</sup>	3.92 ± 0.68 <sup>△</sup>	1.95 ± 0.40 <sup>△</sup>	0.35 ± 0.10
决明子中剂量	1.02 ± 0.30 <sup>△</sup>	3.64 ± 0.47	1.77 ± 0.30	0.36 ± 0.07
决明子高剂量	0.73 ± 0.24 <sup>△△</sup>	4.09 ± 0.45 <sup>△</sup>	2.07 ± 0.15 <sup>△</sup>	0.37 ± 0.17

注: 与正常组相比, \* $P < 0.05$ ; 与模型组相比, <sup>△</sup> $P < 0.05$ , <sup>△△</sup> $P < 0.01$ 。

### 4.2. 肠道菌群的细菌定量

与正常组相比, 高脂模型组的双歧杆菌, 乳酸杆菌的数量降低( $P < 0.05$ ), 尤其双歧杆菌减少较为明显; 金黄色葡萄球菌和阴沟肠杆菌的数量升高( $P < 0.05$ ), 但是变化不明显。与模型组相比, 药物干预组的双歧杆菌, 乳酸杆菌的数量均出现了明显的升高( $P < 0.05$ ), 尤其以决明子中剂量组升高最为显著; 而金黄色葡萄球菌和阴沟肠杆菌的数量也有明显下降( $P < 0.05$ ), 以决明子高剂量组下降最为明显。见图 1。



注: 与正常组相比, \* $P < 0.05$ ; 与模型组相比, <sup>△</sup> $P < 0.05$ , <sup>△△</sup> $P < 0.01$ 。

**Figure 1.** Relative quantification results of different concentrations of drugs on intestinal flora of mice in each group ( $\bar{X} \pm S, n = 6$ ), different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ )

**图 1.** 不同浓度药物对各组小鼠肠道菌群的相对定量结果( $\bar{X} \pm S, n = 6$ ), 不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )

## 5. 讨论

### 5.1. 血清学指标的变化分析

高脂饮食诱导所致的肥胖属于代谢综合征的范畴，是代谢紊乱的重要标志，这种肥胖是以血液中的TG升高为主的一类代谢疾病，是动脉粥样硬化，冠心病等慢性疾病的独立诱发因素[3]。高脂饮食更是促进了肥胖的发生。临床中，高脂饮食诱发的肥胖常伴有较高的甘油三酯水平，有效且安全地改善机体高甘油三酯水平，对于控制肥胖以及肥胖诱发的代谢性疾病具有一定临床意义。决明子为传统常用中药，始载于《神农本草经》，列为上品，具有清肝明目，润肠通便，调压降脂的功效，是我国卫生部首批公布的药食同源食物之一，而决明子主要含有的成分就是蒽醌类物质[4]。现代药理研究表明，决明子提取物蒽醌类化合物具有明显的降血脂作用。研究人员采用色谱法分离方法，结合其理化性质以及病理模型等实验方法，确定决明子的这种药理作用主要是通过降低甘油三酯(TG)含量，从而达到降低机体血脂的作用[5]。

### 5.2. 肠道菌群的变化分析

乳酸杆菌和双歧杆菌是可发酵碳水化合物产生大量乳酸的一类菌，能够产生维生素B等有益物质，促进肠道有益菌的生长，抑制脂多糖，调节免疫作用，是一类能够在动物体内发挥重要作用的有益菌[6]。而肥胖作为一种代谢性疾病的独立诱发因素，会对体内肠道中的有益菌产生抑制作用，使其种属丰度降低。临床上对肥胖和瘦小的儿童进行横断实验分析发现，肥胖比瘦小的儿童，厚壁菌门/拟杆菌门的比值显著升高，乳酸菌数量降低。而决明子提取物蒽醌类化合物可以促进肠道有益菌的繁殖，故在使用决明子干预后乳酸杆菌和双歧杆菌这两种有益菌的数量明显增高。有研究发现，早期肠道菌群中金黄色葡萄球菌的定植与系统性炎症因子标志物CD14的浓度升高显著相关，可得出结论，金黄色葡萄球菌可能是一种低度炎症触发器，可能参与肥胖的形成[7]。决明子蒽醌类物质能够改变金黄色葡萄球菌细胞膜的通透性，使细胞内的原生质溢出，进而造成膜局部破损，最终导致细菌细胞完全解体，有助于小鼠度过炎症期，恢复健康，具有良好的体内保护作用，所以在药物干预后其数量发生了下降。赵立平研究团队首次发现了阴沟肠杆菌是一种能够直接引起肥胖的细菌，在极度肥胖的人体内分离出这种细菌并注射到小鼠体内，可发现这些小鼠失去了对高脂的防御能力而变得极度肥胖[8]。而决明子蒽醌类物质可能是通过调节血脂，来抵抗这种细菌造成的肥胖，所以在药物干预后其数量会发生下降。

## 6. 结论

基于前期的研究和本实验结果，发现决明子提取物蒽醌类化合物的药效机制可能与条件致病菌金黄色葡萄球菌和阴沟肠杆菌的减少、有益菌双歧杆菌和乳酸杆菌的增加有关。虽然国内外已经对肠道菌群与肥胖相关性的机制进行了大量的研究，已经确定肥胖患者肠道菌群组成发生变化，但是肠道菌群影响肥胖确切性机制仍不明确，有待进一步研究，肠道菌群对肥胖的贡献幅度仍是未知数。并且决明子提取物蒽醌类化合物干预肠道菌群后在机体内具体是通过何种途径达到治疗肥胖的效果的，也有待于进一步探讨。

## 基金项目

- 1) 2020年宁夏回族自治区卫生健康委员会科研项目课题(枸杞多糖及不同有氧运动强度对高脂饮食小鼠所致肥胖的肠道菌群影响)。
- 2) 2020年大学生创新创业训练计划项目(S202010752008)。

## 参考文献

- [1] 李琨, 刘安军, 王稳航, 等. 决明子活性成分对小鼠肠道菌相的影响[J]. 天津科技大学学报, 2005, 20(2): 19-21.
- [2] 梅璐, 袁杰利, 郑鹏远. 益生菌联合决明子总蒽醌通过肠肝轴对非酒精性脂肪肝大鼠的干预研究[C]//中华预防医学会微生物生态学学术会议. 重庆: 中华医学会, 2014: 185-186.
- [3] 赵省如. 决明子对小鼠肠道屏障影响的研究[D]: [硕士学位论文]. 南昌: 南昌大学, 2017.
- [4] 姚瑛瑛. 高脂饲料及药物干预对大鼠肠道微生物的影响[D]: [硕士学位论文]. 太原: 山西大学, 2014.
- [5] 孟庆菊. 一种决明子茶饮及其制备方法[P]. 中国专利, CN109938135A. 2019-06-28.
- [6] 贾志飞. 决明子低聚糖的制备及其对双歧杆菌的增殖作用[D]: [硕士学位论文]. 芜湖: 安徽工程大学, 2020.
- [7] 张加雄, 万丽, 胡轶娟, 等. 决明子降血脂有效部位的研究[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(6): 904-905.
- [8] 冯艳平. 决明子降血脂有效成分探讨[J]. 中国医药指南, 2013, 11(5): 258-259.