

# 基于16S rDNA扩增子测序与流式细胞仪分析 葛根改善免疫与肠道微生物的关系

蒋单栋<sup>1</sup>, 么春艳<sup>2</sup>, 肖鹏<sup>1</sup>, 邹莹<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>杭州医学院临床医学院, 浙江 杭州

<sup>2</sup>杭州医学院食品科学与工程学院, 浙江 杭州

<sup>3</sup>浙江中医药大学附属第二医院, 浙江 杭州

收稿日期: 2022年8月25日; 录用日期: 2022年11月4日; 发布日期: 2022年11月15日

## 摘要

本文基于16S rDNA扩增子测序与流式细胞仪深入探索葛根改善免疫的机制, 并分析肠道微生物与免疫的关系。葛根灌胃四周后, 取血, 测定血清中TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6, 运用流式细胞仪测定血清中T、B淋巴细胞数量, 16S rDNA扩增子测序粪便中肠道微生物菌群变化。结果显示, 与空白对照组比较, 各剂量葛根皆降低炎症因子, 改善机体免疫状态, 其中以低剂量最为显著( $P < 0.05$ )。流式细胞仪结果显示, 各剂量组葛根提取物都显著增加血清中T、B淋巴细胞数量( $P < 0.05$ ), 增长幅度以低剂量最为显著( $P < 0.01$ )。16S rDNA扩增子测序结果显示, 葛根提取物可以特异性增高与免疫相关肠道微生物的丰度, 如梭状芽孢杆菌、罗氏杆菌、狄氏副拟杆菌、肠球菌等, 以狄氏副拟杆菌最为显著。Alpha多样性指数组间差异分析提示葛根能够提高肠道微生物的丰度, 提高微生物分布均匀性。PCoA分析提示葛根能较显著改变肠道内微生物的菌种丰度与组成结构。因此, 葛根能够提高免疫功能, 降低炎症因子, 增加T、B淋巴细胞数量, 并可能通过特异性改变肠道微生物, 如狄氏副拟杆菌, 增加肠道微生物多样性等途径发挥免疫调节作用。

## 关键词

葛根, 肠道微生物, 免疫, 16S rDNA扩增子测序

## Based on 16S rDNA Amplicon Sequencing and Flow Cytometry, the Relationship between Pueraria Improving Immunity and Intestinal Microorganism Was Analyzed

\*通讯作者。

文章引用: 蒋单栋, 么春艳, 肖鹏, 邹莹. 基于 16S rDNA 扩增子测序与流式细胞仪分析葛根改善免疫与肠道微生物的关系[J]. 食品与营养科学, 2022, 11(4): 277-289. DOI: 10.12677/hjfn.2022.114032

Shandong Jiang<sup>1</sup>, Chunyan Yao<sup>2</sup>, Peng Xiao<sup>1</sup>, Ying Zou<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>School of Clinical Medicine, Hangzhou Medical College, Hangzhou Zhejiang

<sup>2</sup>Institute of Food Science and Engineering, Hangzhou Medical University, Hangzhou Zhejiang

<sup>3</sup>The Second Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou Zhejiang

Received: Aug. 25<sup>th</sup>, 2022; accepted: Nov. 4<sup>th</sup>, 2022; published: Nov. 15<sup>th</sup>, 2022

Abstract

The aim of this study was to explore the immune improvement mechanism of Pueraria based on 16S rDNA amplicon sequencing and flow cytometry, and to analyze the relationship between intestinal microbes and immunity, measuring the serum levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-6 w, determining the number of T and B lymphocytes in serum by flow cytometry. The changes of intestinal microflora in feces were sequenced by amplicon of 16S rDNA. The results showed that compared with the blank control group, all the doses of pueraria decreased inflammatory factors and improved the immune state of the body, and the low dose was the most significant ( $P < 0.05$ ). Flow cytometry results showed that the number of T and B lymphocytes in serum of pueraria root extract in each dose group was significantly increased ( $P < 0.05$ ), and the increase rate was most significant in low dose group ( $P < 0.01$ ). 16S rDNA amplified sequencing results showed that pueraria root extract could specifically increase the abundance of immune-related intestinal microorganisms, such as *Clostridium difficile*, Roche, *Parabacteroides dieldii*, enterococcus, etc. The difference analysis of Alpha diversity index between groups suggested that pueraria root could improve the abundance and distribution uniformity of intestinal microorganisms. PCoA analysis indicated that pueraria could significantly change the species abundance and composition of intestinal microorganisms. Therefore, pueraria root can improve immune function, reduce inflammatory factors, increase the number of T and B lymphocytes, besides, it may play an immunomodulatory role by changing the intestinal microflora, such as parabens Diels, and increasing the diversity of intestinal microflora.

Keywords

Kudzu Root, Enteric Microorganism, Immune, 16S rDNA Amplicon Sequencing

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

葛根，又名葛藤、葛麻叶、粉葛藤等[1]，是豆科植物葛(*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi)的块根，乃我国常用的传统中药材，性凉，味甘、辛。有解肌退热，透疹，生津止渴，升阳止泻之功[2]。异黄酮类化合物是葛根主要的活性成分，包括葛根素、大豆甙元、大豆甙、大豆素、葛根醇及异黄酮甙等有效活性物质[3]。

宏基因组测序(Metagenome)最初由 Handelsman [4]提出，泛指测定特定环境样品(如人类和动物的肠道、母乳、土壤、冰川和海洋等环境)中所有微生物群落的基因组，主要分为全基因组测序和 16S rDNA

测序两大类。16S rDNA 扩增子测序(16S rDNA Amplicon Sequencing)是以环境样品中的 16S rDNA 序列为研究对象,以测序分析和功能基因筛选为研究手段,以阐明微生物多样性、种群结构、进化关系、相互协作关系为研究目标的一种微生物学研究方法[5]。流式细胞仪(Flowcytometer)是对细胞进行自动分析和分选的装置,是综合运用各学科知识的结晶[6]。随着荧光色素化学、单克隆抗体技术的不断发展,流式细胞仪已广泛用于测量分析经特异荧光标记的免疫细胞。流式细胞仪存在定量、灵活、快速等特点,在现代免疫技术中占据着十分重要的地位[6]。

人类肠道是一个多元化和充满活力的微生态系统,人体肠道内有 1000~1150 种,约 100 万亿细菌,是人体细胞数量的 10 倍,每个人至少有 160 种优势菌群[7]。在健康人体的胃肠道微生物中,拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和厚壁菌门(*Firmicute*)为主,包括拟杆菌属、乳杆菌属、卟啉单胞菌属、梭状芽孢杆菌、柔嫩梭菌属等。其他丰度较少的门类有放线菌门(*Actinobacteria*),如双歧杆菌属、产气柯林斯菌属;变形菌门(*Proteobacteria*),如肠杆菌属、幽门螺杆菌;疣微菌门(*Verrucomicrobia*)和产甲烷古菌等[8]。诸多研究证明肠道微生物菌群与肥胖、糖尿病、心脑血管疾病、炎症性肠炎、胃肠道癌症和自身免疫性疾病等具有一定的相关性[9]。

有研究表明,肠道微生物的种类和代谢产物不仅促进机体免疫系统的发育,而且参与调节机体的免疫系统[10]。黏液层的存在可有效防止细菌移位(bacterial translocation, BT),而肠道微生物的存在则可激发杯状细胞分泌黏蛋白(Mucin, MUC),尤其是 MUC-2,保障黏液层结构的完整,从而发挥生物屏障作用。MUC-2 缺失或黏蛋白糖基化异常时,肠屏障完整性受损、肠粘膜通透性增加,细菌过度增殖,进一步触发全身性反应和多系统器官功能衰竭[11][12][13]。此外,肠道微生物诱导淋巴组织发育[14]。肠道黏膜相关淋巴组织(gut-associated lymphoid tissues, GALT)是机体黏膜免疫的重要部分,由集合淋巴小结(Peyer's patches, PP)、孤立淋巴滤泡(isolated lymphoid follicles, ILF)和肠系膜淋巴结(mesenteric lymph nodes, MLN)共同组成[15]。而肠道微生物及其代谢产物则是重要的抗原,经树突状细胞(dendritic cells, DC)吞噬而提呈[16],刺激 GALT 的发育成熟。不仅如此,GALT 所诱导的免疫反应又受控于肠道菌群物种结构及其代谢活性。此外,肠道菌群可被不同家族的 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLR)识别,激活 MAL-MYD88 和 TRAM-TRIF 信号通路,产生不同的细胞因子调节 T 细胞向不同亚群分化,维持辅助性 T (helper T, Th)细胞和调节性 T (regulatory T, Treg)细胞动态平衡,保障机体免疫平衡。

本课题组前期研究发现葛根喷干速溶粉(Pueraria Spray Dry Instant Powder, PSIP)灌胃四周较空白组能提高小鼠胸腺比,显著提高小鼠脾脏比( $P < 0.05$ ),显著提高间接反应 B、T 淋巴数量的血清溶血素、溶血空斑、迟发性超敏反应试验( $P < 0.05$ )。为探索 PSIP 改善正常小鼠免疫的机制,本课题组运用流式细胞仪测定血清中 B、T 淋巴细胞数量,16S rDNA 扩增子测序粪便中肠道微生物菌群,较空白组发现,PSIP 组肠道中诸多与机体免疫系统产生与维持相关的肠道菌种出现了特异性表达或显著表达,提示 PSIP 可能通过影响肠道微生物菌种而发挥提高机体免疫的功能。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料与仪器

葛根喷干速溶粉(Pueraria Spray Dry Instant Powder, PSIP) (葛根素 10%)黄山华绿园生物科技有限公司; HH-4 数显恒温水浴锅,常州奥华仪器有限公司; DWP-9082-II 型电热恒温培养箱,上海龙跃仪器设备有限公司; TDZ5 型台式低速离心机,湖南赫西仪器装备有限公司; Multiskan FC 型酶标仪,上海赛默飞尔仪器有限公司; 小鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IFN 试剂盒,武汉博士德生物有限公司; 小鼠血清 IL-6 试剂盒,南京建成生物工程研究所。

## 2.2. 实验方法

### 2.2.1. 实验动物及分组

清洁级 ICR 小鼠, 由浙江省实验动物中心提供, 实验动物使用许可证号为 SYXK (浙) 2014-2008, 实验动物于 SPF 级动物房适应环境 5~7 d, 环境温度 20°C~25°C, 湿度 40%~70%, 明暗交替时间 12 h/12 h。实验动物共 40 只, 分别用于: ① 流式细胞仪测定血清 T、B 淋巴细胞数量; ② 16S rDNA 扩增子测序小鼠粪便。实验开始前, 小鼠适应性饲养 1 周, 称量实验小鼠初始体重, 按初始体重随机分为 4 组: 空白对照组、PSIP 高剂量组、中剂量组和低剂量组, 10 只/组。空白对照组灌胃(Intraperitoneal injection, *i.p.*) 给予生理盐水、样品组灌胃给予 PSIP 3 g/Kg、1.5 g/Kg 和 0.75 g/Kg, 灌胃体积 0.1 ml/10 g, 每天一次, 连续 4 周。

### 2.2.2. 流式细胞仪对小鼠血清中 T、B 淋巴细胞的测定

实验结束当天采血, 以 3000 r/min 离心 10 min 后分离血清, 有色染料 FITC 标记 CD3, PE 标记 CD19, BD FACSC Elesta 型流式细胞仪 405 nm/488 nm/640 nm 三激光 12 色测定血清中 T、B 淋巴细胞的数量, Q1 区代表 B 淋巴细胞, Q4 区代表 T 淋巴细胞。

### 2.2.3. 小鼠粪便 16S rDNA 扩增子测序

在实验结束前两天收集小鼠粪便, -80°C 保存。采用 PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO, Cat.No.12888)试剂盒对样本基因组 DNA 进行提取, 利用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓度, 利用保守区设计通用引物。取适量的基因组 DNA 为模板, 根据测序区域进行选择 PCR 扩增, 使用带有 Barcode 的特异引物和高效高保真酶进行 PCR 扩增, 确保扩增效率和准确性, 纯化后建立标准化文库, 采用 Illumina 测序仪进行测序。测序得到的原始数据存在一定比例的干扰数据, 为使信息分析的结果更加准确可靠, 首先对原始数据进行过滤、拼接, 得到有效数据, 随后以 97%的一致性将序列聚类成为运算分类单位(Operational Taxonomic Units, OTUs), 并对 OTUs 的代表序列进行物种注释。

### 2.2.4. 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件进行分析, 数据资料用均值加减标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 方差齐时采用单因素方差分析, 组间差异显著性采用 LSD 方法进行多重比较检验; 方差不齐时采用秩和检验, 组间差异比较采用  $P < 0.05$ , 表示差异有统计学意义。

## 3. 实验结果

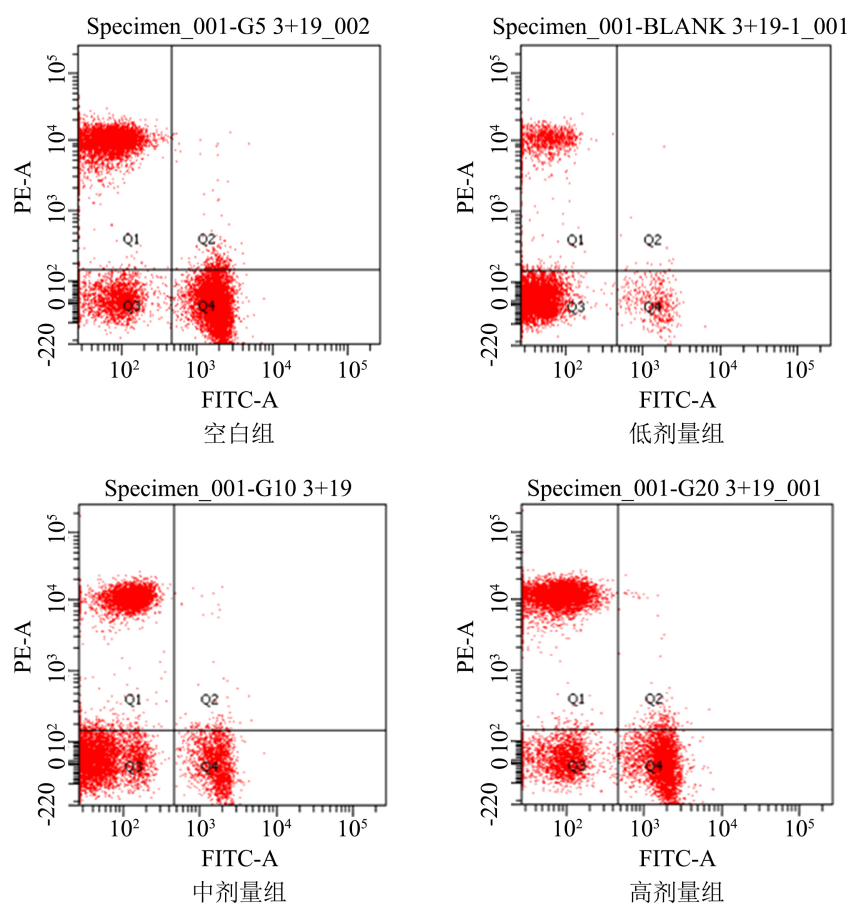
### 3.1. 流式细胞仪检测 PSIP 对小鼠血清中 T、B 淋巴细胞的影响

有色染料 FITC 标记 CD3, PE 标记 CD19, 分别对应 T、B 淋巴细胞特异的表面抗原。流式细胞仪测量血清中 T、B 淋巴细胞数量变化的结果见表 1。与空白组相比, 各剂量 PSIP 均显著提高血清中 T、B 淋巴细胞, 低、中剂量 PSIP 组显著提高血清中 T、B 淋巴细胞( $P < 0.01$ ), 高剂量 PSIP 增高幅度有所降低但仍具有显著性( $P < 0.05$ )。并且血清中 T、B 淋巴细胞数量增高幅度随 PSIP 浓度增高而逐级降低, 呈线性变化, 以低剂量 PSIP 组增高最显著, 该结果也与本课题组前期实验中低剂量 PSIP 组溶血空斑试验、血清凝集素试验、迟发性超敏反应试验较空白对照组显著提高相一致。流式细胞仪测量血清中 T、B 淋巴细胞分布见图 1, 其中 Q1 区代表 B 淋巴细胞, Q4 区代表 T 淋巴细胞, 可以直观得发现各剂量 PSIP 灌胃后 Q1 区和 Q4 区的细胞数量明显增高, 从免疫学层面进一步验证 PSIP 改善小鼠免疫水平的功能。

**Table 1.** Percentage of B and T lymphocyte cells in serum of blank group and PSIP group at each dose  
**表 1.** 空白组与各剂量 PSIP 组血清中 B、T 淋巴细胞占细胞总数百分比

组别	剂量	B 淋巴细胞	T 淋巴细胞
空白	0	1.2% ± 0.25%	0.3% ± 0.11%
低剂量	0.75	7.9% ± 0.85%**	6.3 ± 1.43**
中剂量	1.5	5.5% ± 1.12%**	4.2% ± 1.55%**
高剂量	3	2.8% ± 0.78%*	1.5% ± 0.64%*

注：与空白组比较，\*P < 0.05，\*\*P < 0.01。



**Figure 1.** Serum B and T lymphocyte were measured in flow cytometry group and PSIP group

**图 1.** 流式细胞仪测定空白组与各剂量 PSIP 组血清中 B、T 淋巴细胞

### 3.2. 16S rDNA 扩增子测序分析 PSIP 对小鼠肠道微生物的影响

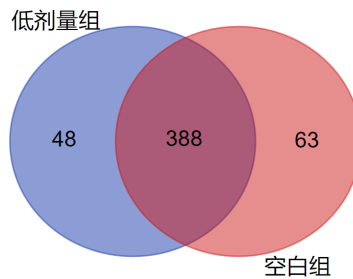
本实验就对小鼠肠道微生物的影响进行了初步研究，实验结果如下。我们将空白组与低剂量 PSIP 的粪便 DNA 测序得到原始数据，去除接头后，用 PEAR 软件将有 overlap 的序列进行拼接，使用 QIME 软件对拼接数据进行过滤，过滤掉含 N 较多或者低质量序列，最后进行嵌合体过滤得到有效序列(Effective Tags)。PSIP 对小鼠各水平肠道微生物的影响见表 2。空白组和低剂量组在界(Kingdom)门(Phylum)纲(Class)目(Order)科(Family)属(Genus)种(Species) 7 个水平上两者并无显著性差异(P > 0.05)。

**Table 2.** Effects of *Pueraria lobata* extract on various levels of intestinal microbes in mice  
**表 2.** PSIP 对小鼠各水平肠道微生物的影响

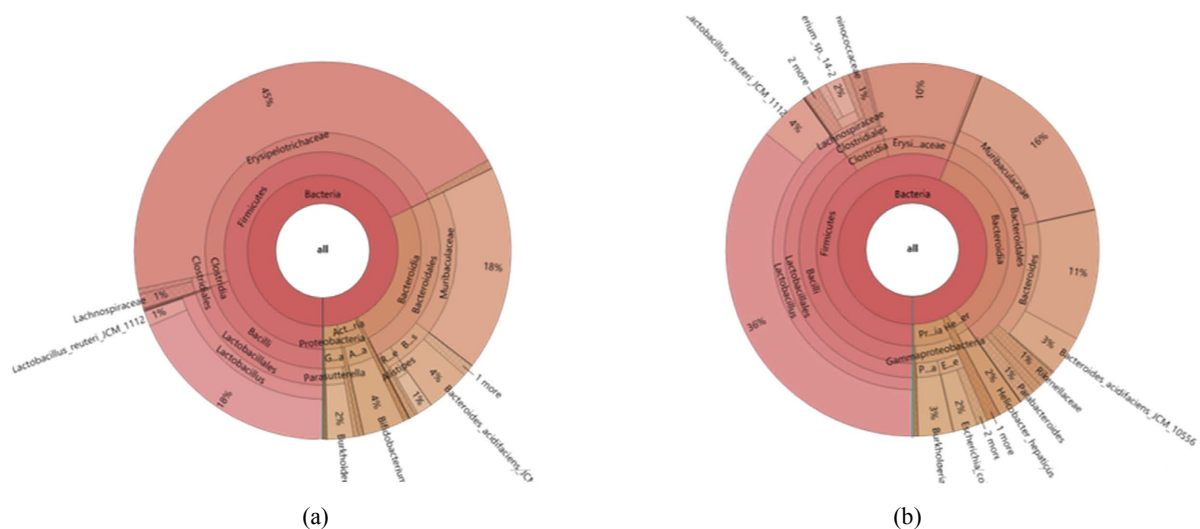
组别 种属	界	门	纲	目	科	属	种
空白组	31,715 ± 527	31,715 ± 527	31,716 ± 527	31715.7 ± 527	31,672 ± 492	25,164 ± 1651	5331 ± 1204
模型组	29,604 ± 1470	29,604 ± 1470	29,604 ± 1470	29,608 ± 1470	29,590 ± 1473	22,759 ± 2605	5038 ± 1380

因此，我们进一步使用 uparse 软件对所有样品的有效序列进行聚类分析，以 97% 的一致性将序列聚类成为物种聚类单位(Operational Taxonomic Units, OTUs)，一种 OTUs 往往对应一种肠道微生物，具体结果见图 2。空白组 OTUs 数为 451，低剂量组 OTUs 数为 436，无显著性差异(P > 0.05)。两组共有 388 种 OTUs，有 48 种 OTUs 为低剂量组特有。特有菌种经数据库查阅，主要包括毛螺旋菌\_UCG\_001、罗氏菌属、梭状芽孢杆菌属、毛螺旋菌\_UCG\_006、狄氏副拟杆菌、瘤胃球菌属、肠球菌属、厌氧棍状菌属、优杆菌属等。

对两组肠道微生物的物种丰度进一步分析，物种注释结果 KRONA 展示如图 3，发现空白组肠道微生物以厚壁菌门(*Firmicute*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)为主，其余为放线菌门(*Actinobacteria*)、变形菌门(*Proteobacteria*)等。相较于空白组，低剂量 PSIP 组表现出较低的厚壁菌门，更高的拟杆菌门和变形菌门，且具有更高的肠道微生物物种丰富性，这提示 PSIP 可能通过肠道微生物发挥免疫调节作用。



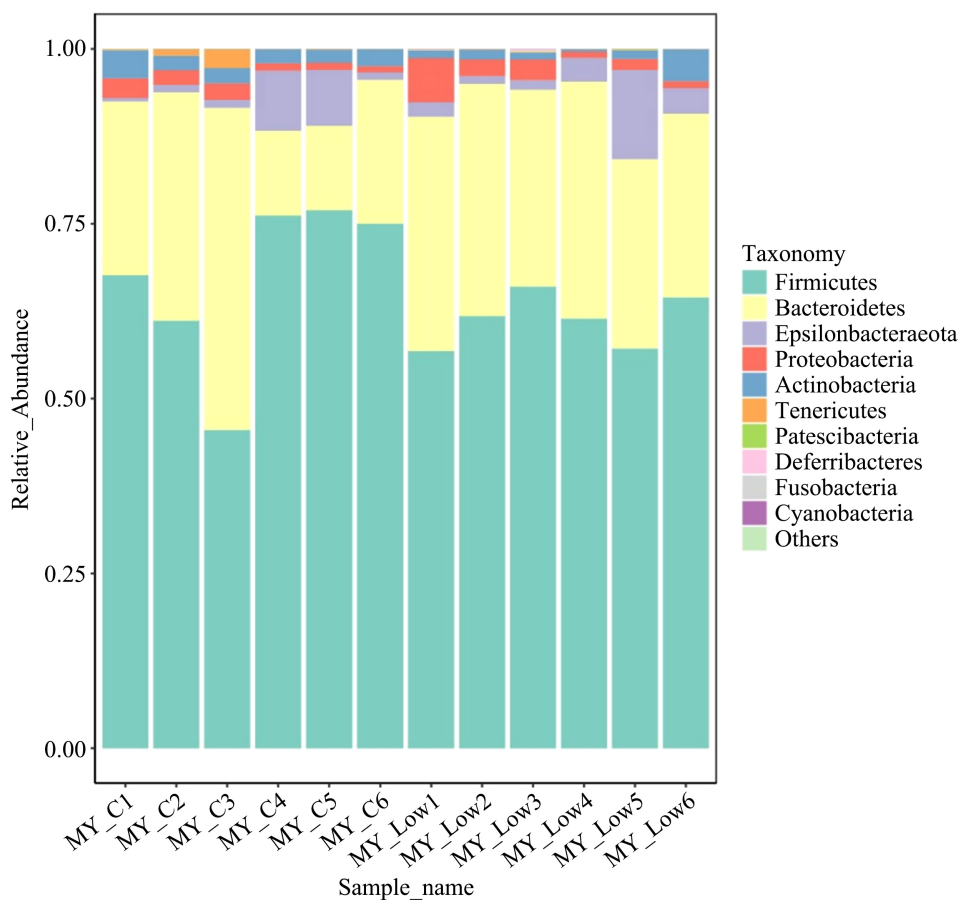
**Figure 2.** The distribution of OTUs in the blank group and the low-dose group  
**图 2.** 空白组与低剂量组 OTUs 分布情况



**Figure 3.** Species annotation results KRONA display. Note: (a) the visual display of KRONA in the blank group; (b) the visual display of KRONA in the low-dose group

**图 3.** 物种注释结果 KRONA 展示。注：(a) 空白组 KRONA 可视化展示；(b) 低剂量组 KRONA 可视化展示

在种水平上对测序的菌种进行排序,选取最大丰度排名前 10 的物种,生成物种相对丰度柱形累加图,如图 4,以便直观查看各样品在不同分类水平上,相对丰度较高的物种及其比例。其中低剂量 PSIP 嗜酸杆菌 JCM\_10556 (*Bacteroides\_acidifaciens*\_JCM\_10556)和罗伊氏乳杆菌 JCM\_1112 (*Lactobacillus\_reuteri*\_JCM\_1112)等益生菌的相对丰度较空白对照组显著上升,而啮齿类螺杆菌(*Helicobacter\_rodentium*)、大肠埃希氏菌 TA464 (*Escherichia\_coli\_TA464*)则显著下降。



**Figure 4.** Column accumulation chart of the top 10 species relative abundance at two levels  
**图 4.2** 种水平上前 10 物种相对丰度柱形累加图

在属水平上选取丰度排名前 35 菌属,根据其在每个样品中的丰度信息,从物种和样品两个层面进行聚类,绘制成物种丰度聚类热图,如图 5。我们分析发现,较空白对照组,低剂量 PSIP 组中毛螺旋菌\_UCG\_001、罗氏菌属、梭状芽孢杆菌属、毛螺旋菌\_UCG\_006、狄氏副拟杆菌、肠球菌等丰度特异性增高,物种热度最大。

为进一步对比低剂量 PSIP 组和空白对照组肠道微生物变化,我们采用 LEFSE 分析和 T-test 分析组间显著差异的物种,见图 6。绘图后显示,较空白对照组,低剂量 PSIP 组中狄氏副拟杆菌(*parebacteroides\_YL27*)、巴氏真杆菌(*Eubacteriumbrachy*)和 *Muribaculum* 的丰度显著增长,而罗姆布茨菌(*Romboutsia*)、丹毒丝菌目(*Erysipelotrichales*)、厌氧原体目(*Anaeroplasmatales*)、*Duboliella* 等显著降低。为比较两组间肠道微生物分布的均匀性,我们采用 Alpha 多样性指数组间差异分析,选用 simpson 和 chao1 指数,如图 7。结果显示低剂量 PSIP 组 simpson 和 chao1 指数均显示高于空白对照组。

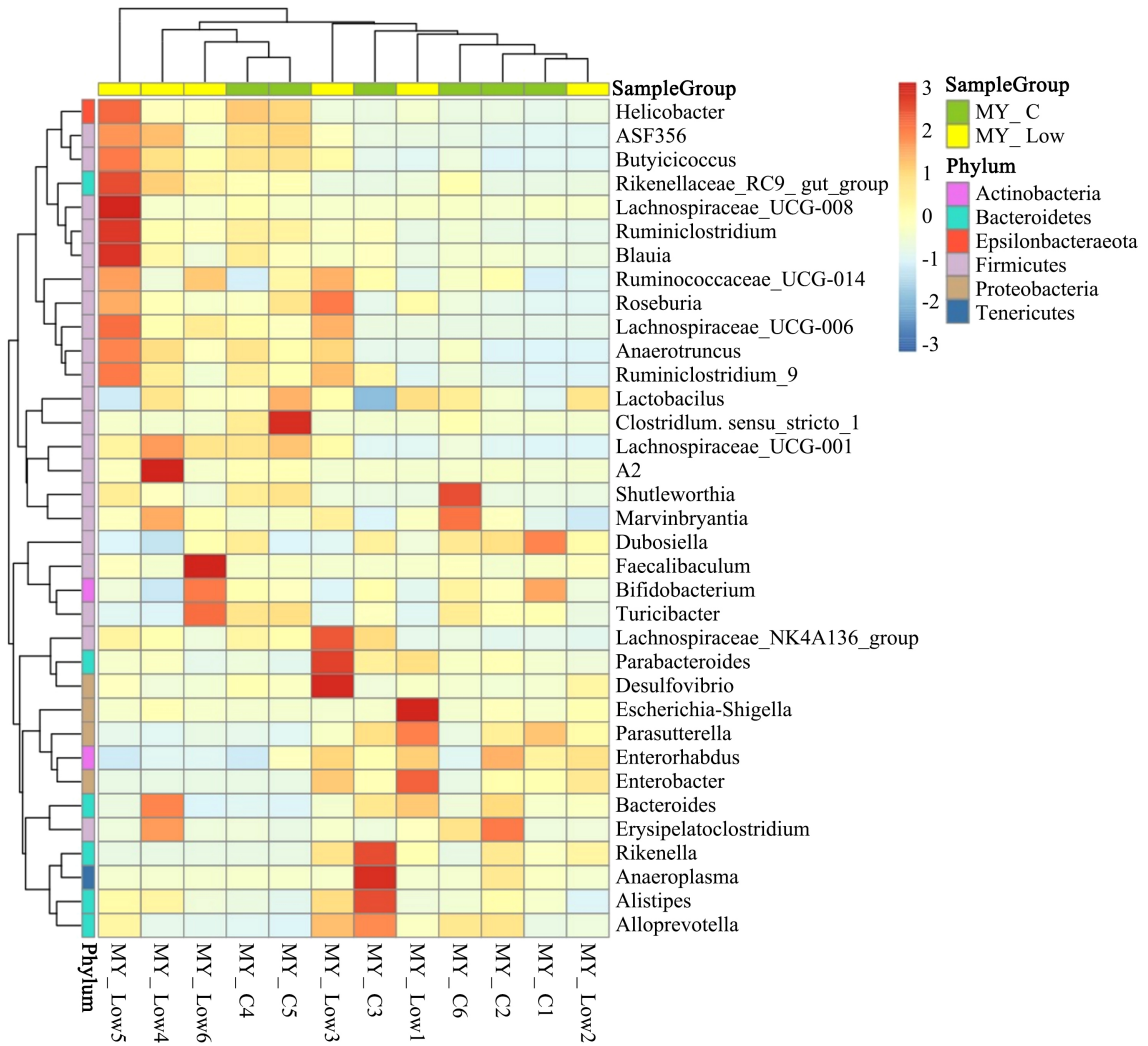


Figure 5. Cluster thermograms of species abundance at genus level  
图 5. 属水平上物种丰度聚类热图

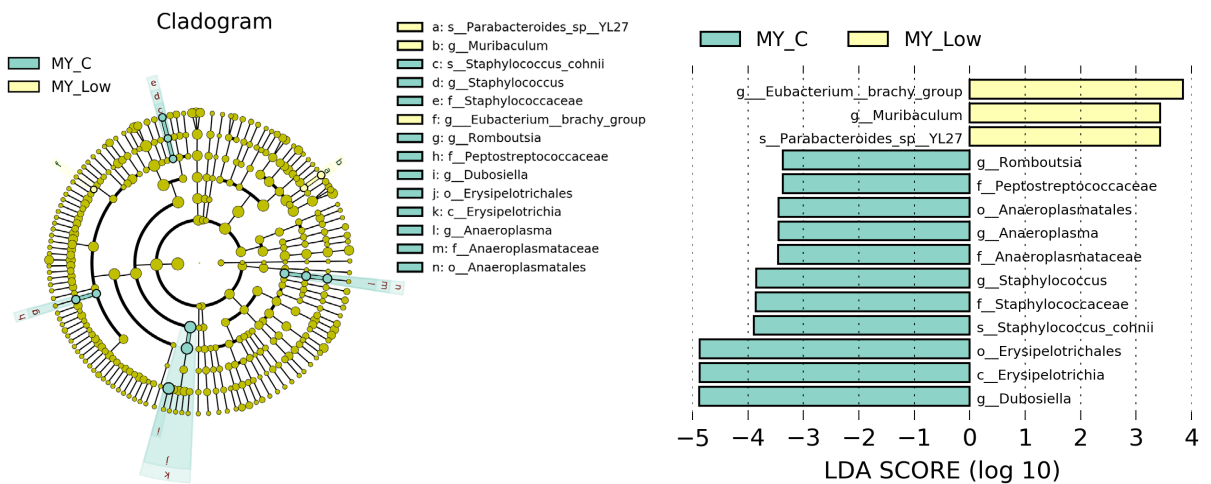
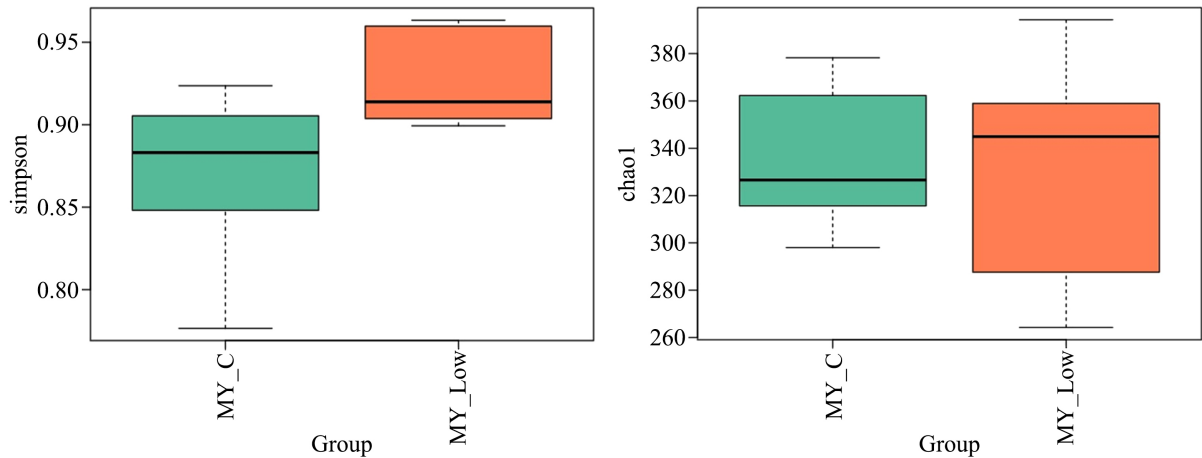


Figure 6. Lefse analysis and T-test group significantly different microbial analysis  
图 6. LEFSE 分析和 T-test 组间显著差异微生物分析

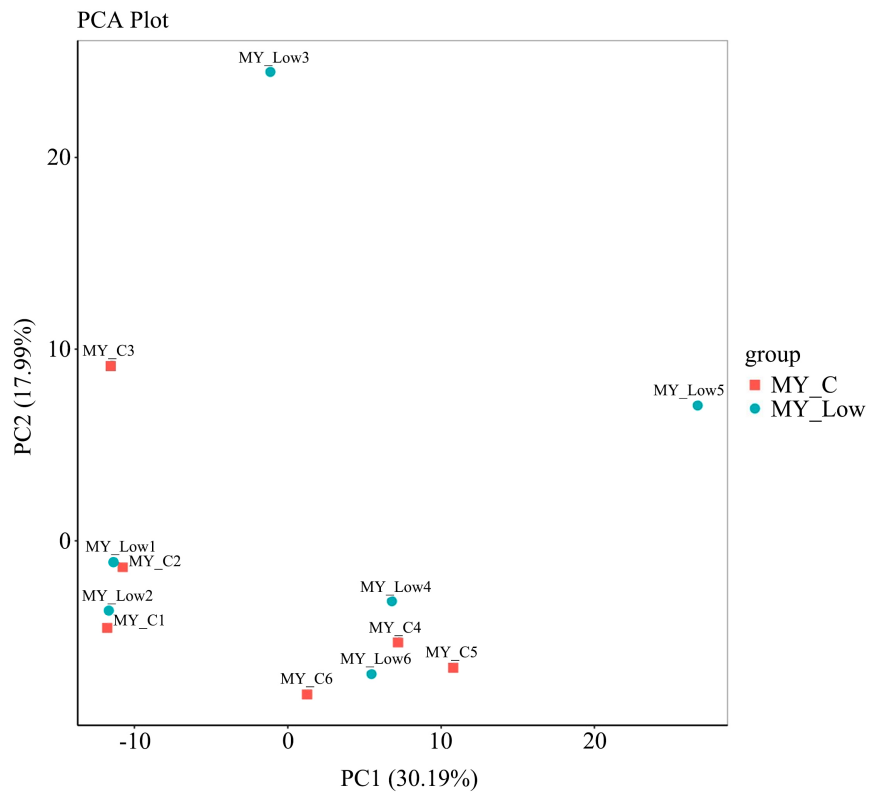




**Figure 7.** Analysis of microbial homogeneity between Simpson and chao1 groups

**图 7.** Simpson 和 chao1 组间微生物均匀性分析

最后，我们基于 WeightedUnifrac 距离和 UnweightedUnifrac 距离实施 PCoA 分析，并选取贡献率最大的主坐标组合进行作图，如图 8。两样品距离越接近，表示物种组成结构越相似，因此群落结构相似度高度的样品倾向于聚集在一起，群落差异很大的样品则会远远分开。结果显示低剂量 PSIP 组的样品主要分布于坐标轴的右上方，而空白对照组的样品则主要分布于坐标轴的左下方，提示 PSIP 能够较显著改变肠道内微生物的菌种丰度与组成结构。



**Figure 8.** Analysis of PCoA in blank group and low-dose PSIP group

**图 8.** 空白组与低剂量 PSIP 组 PCoA 分析

## 4. 结果与讨论

葛根总黄酮由葛根素、大豆甙等黄酮类化合物组成,是葛根发挥药效学作用的主要活性成分。肖嫩群等[17]发现,葛根芩连汤可促进肠道湿热证泄泻小鼠肠道乳杆菌和双歧杆菌增生,提高双歧杆菌与肠杆菌的数量比值(B/E 值),从而抑制病原菌的黏附、定植和入侵,以提高机体对病原微生物的免疫防御能力。柏琳等[18]发现葛根总黄酮能够明显下调调佐剂性关节炎大鼠致炎因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的表达,降低大鼠血清中致炎因子含量,进而改善炎症状态,提高免疫功能。我们的实验结果也证实葛根可以改善免疫功能,增强体液免疫和细胞免疫,特异性提高肠道内免疫相关微生物的丰度。

所有白细胞都有 CD45 特异性标志,其中 T 淋巴细胞表达 CD3, B 淋巴细胞表达 CD19。表 2 结果显示三个剂量的 PSIP 能显著 B、T 淋巴细胞数量( $P < 0.05$ ),低剂量增长幅度最为显著( $P < 0.01$ ),提示 PSIP 能够通过 B、T 淋巴细胞提高体液和细胞免疫功能。B 细胞在抗原刺激下可分化为浆细胞,浆细胞可合成和分泌抗体,主要执行机体的体液免疫。T 淋巴细胞主要介导细胞免疫,根据表达 CD4 和 CD8 的不同而分为辅助 T 细胞(helper T cell)和细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T cell)。正常机体免疫应答有赖于 T 淋巴细胞的调节作用,尤其是 Th 细胞和 Treg 细胞的相互制约和调节。在病理状态下,这两种 T 细胞之间的制约和平衡失调,可导致机体免疫功能紊乱[19]。

图 2 显示低剂量 PSIP 小鼠粪便中具有 48 种特有菌群,其中罗氏菌属、梭状芽孢杆菌属等与机体免疫力的产生与维持密切相关。肠道内的梭状芽孢杆菌(*Clostridium*)是诱导黏膜免疫系统和全身免疫系统的重要因子[20],通过刺激结肠上皮细胞产生 TGF- $\beta$ ,诱导 T 细胞分化为 Treg 细胞[21]。正常机体免疫应答有赖于 T 淋巴细胞的调节作用,尤其是 Th 细胞和 Treg 细胞的相互制约和调节。在病理状态下,这两种 T 细胞之间的制约和平衡失调,可导致机体免疫功能紊乱[19]。当肠道中存在高丰度微生物菌群时会诱导产生较多的 Th1 和 Th17 调节性 T 细胞,而在无菌小鼠中这 2 个调节性 T 细胞的含量非常少[22]。Geuking 将无菌鼠和用 ASF (altered schaedler flora)定植特定菌株(包括 2 个乳酸杆菌、1 个拟杆菌、1 *Flexistipes* 属的螺旋型细菌、4 个氧敏感梭菌)的无菌鼠比对研究,发现 ASF 定植的无菌小鼠在结肠固有层黏膜激活和重新产生 Treg 细胞[23]。

图 3~6 显示的低剂量 PSIP 较空白对照组增加的部分微生物菌群已被证明与免疫的产生维持与调节密切相关,如梭状芽孢杆菌属、罗氏菌属、肠球菌、狄氏副拟杆菌等。此外,PSIP 还可降低丹毒丝菌目(*Erysipelotrichales*)、厌氧原体目(*Anaeroplasmatales*)、*Duboliella* 等有害菌,提高肠道免疫屏障功能。因此,我们推测 PSIP 的提高免疫功能与肠道微生物菌群密切相关,尤其是显著增高的免疫相关微生物。

肠道内的梭状芽孢杆菌(*Clostridium*)是诱导黏膜免疫系统和全身免疫系统的重要因子[20],通过刺激结肠上皮细胞产生 TGF- $\beta$ ,诱导 T 细胞分化为 Treg 细胞[21]。当肠道中存在高丰度微生物菌群时会诱导产生较多的 Th1 和 Th17 调节性 T 细胞,而在无菌小鼠中这 2 个调节性 T 细胞的含量非常少[22]。Geuking 将无菌鼠和用 ASF (altered schaedler flora)定植特定菌株(包括 2 个乳酸杆菌、1 个拟杆菌、1 *Flexistipes* 属的螺旋型细菌、4 个氧敏感梭菌)的无菌鼠比对研究,发现 ASF 定植的无菌小鼠在结肠固有层黏膜激活和重新产生 Treg 细胞[23]。因此,PSIP 增高的梭状芽孢杆菌丰度可能对维持和调节免疫平衡起重要作用。

典型的罗氏菌属能产生丁酸、丙酸等短链脂肪酸,改善肠道微生物多样性,提高葡萄糖耐受性。罗氏菌属丰度的减少可能影响多种代谢途径,并与肠易激综合征、II 型糖尿病、神经系统疾病、过敏等多种疾病密切相关[24]。丁酸盐可被游离脂肪酸受体(Free Fatty Acid Receptor, FFAR)识别并传递给肠道免疫细胞,通过多蛋白炎性复合物介导肠道免疫反应,进而有效维持抗炎和促炎之间的炎症状态平衡[25]。PSIP 可能通过提高肠道内罗氏菌属的丰度,增加肠道内丁酸盐浓度,平衡肠道内炎症状态,提高小鼠机体免疫力。

肠杆菌属以阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)为主, 其余有产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)、泰洛肠杆菌(*Enterobacter tylos*)等, 是人体常见的一种共生微生物[10]。Macpherson[26]证实肠杆菌属可能与机体免疫球蛋白 A (Immunoglobulin A, IgA)密切相关。Macpherson [26]将阴沟肠杆菌与其他共生微生物同时给小鼠灌胃, 培养一段时间后通过清洗肠系膜淋巴结(Mesenteric lymph node, MLN)回收菌种, 但在脾细胞和其他组织中没有发现肠杆菌。通过荧光激活技术发现共生菌主要存在于树突细胞(Dendritic Cell, DCs)。肠杆菌等共生细菌在黏膜位置被 DCs 携带并随其一起转移到肠系淋巴结, 阴沟肠杆菌被吞噬后 DCs 就被激活。对小白鼠进行反复的胃内灌入阴沟肠杆菌, 小白鼠黏膜和血清 IgA 可被选择性地诱导。

免疫球蛋白 A (Immunoglobulin A, IgA)在正常人血清中的含量仅次于 IgG, 占血清免疫球蛋白含量的 10%~20%, 按免疫功能分为分泌型 IgA (Secreted IgA, sIgA)与血清型 IgA。分泌型 IgA 是机体黏膜局部抗感染免疫的主要抗体。故又称黏膜局部抗体。每天大约有 3~5 g 的 IgA 被分泌到肠腔, 这个量占人体产生的全部免疫球蛋白的 15% [27], IgA 异常会引起许多免疫方面的疾病, 例如 IgA 肾病、脂泻病、IgA 大疱性皮肤病等疾病。因此 PSIP 极有可能通过阴沟肠杆菌等肠杆菌属诱导血清型及分泌型 IgA 分泌, 进而提高小鼠体液免疫水平。

目前研究来看, 狄氏副拟杆菌(*Parabacteroides distasonis*, *P. distasonis*)可能具有抗炎、免疫调节和代谢调节的潜在功能。*P. distasonis* 的膜组分可以抑制多种促炎因子分泌并稳定 DSS 诱导的结肠炎小鼠的肠道微生物生态[28], 维持肠上皮免疫屏障完整[29]。此外, 人为添加 *P. distasonis* 或增加其丰度可用于抑制高危个体如肥胖者的结肠炎症和肿瘤发生[30]。郭琳[31]等发现猴头菌与 5-ASA 联用可有效抑制小鼠溃疡性结肠炎水平, 重塑肠道微生态环境, 显著提高 *P. distasonis* 相对丰度, 可能通过增加 *P. distasonis* 发挥炎症抑制作用。PSIP 组中 *P. distasonis* 丰度增加显著, 提示 PSIP 的免疫改善功能可能与肠道微生物介导的黏膜免疫密切相关。

Simpson 和 chao1 指数可反应肠道内组间物种多样性差异是否显著。图 7 显示低剂量 PSIP 组 Simpson 和 chao1 指数均显著高于空白对照组, 提示 PSIP 在提高肠道微生物的丰度同时, 还能提高微生物分布均匀性, 增加物种多样性, 增强肠道黏膜免疫功能。PCoA 分析中, 如果样品距离越接近, 表示物种组成结构越相似。因此群落结构相似度高的样品倾向于聚集在一起, 群落差异很大的样品则会远远分开。图 8 显示低剂量 PSIP 组的样品主要分布于坐标轴的右上方, 而空白对照组的样品则主要分布于坐标轴的左下方, 提示 PSIP 能够较显著改变肠道内微生物的菌种丰度与组成结构。

综上所述, PSIP 在前期研究能提高小鼠胸腺比, 显著提高小鼠脾脏比( $P < 0.05$ ), 显著提高间接反应 B、T 淋巴数量的血清溶血素、溶血空斑和迟发性超敏反应( $P < 0.05$ )的基础上, PSIP 能够提高血清中抗病毒因子 IFN 水平, 降低炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平, 显著增加血清中 T、B 淋巴细胞数量, 并可能通过特异性改变肠道微生物, 如狄氏副拟杆菌, 增加肠道微生物多样性和均匀性, 改善肠道微生物结构等途径发挥免疫调节作用。本实验为研究开发新型葛根保健食品提供了理论依据, 但对葛根能否进一步改善免疫功能低下动物的免疫状态仍需进一步探索和研究。

## 基金项目

国家级创新创业训练项目(202113023003); 浙江省大学生科技创新活动计划(新苗人才计划)项目(2021R424006); 浙江省自然科学基金(LQY18H280001); 浙江中医药大学中青年科研创新基金(KC201942); 浙江中医药大学校级科研基金 (2019ZZ03); 浙江省医药卫生科技计划(2021447171)。

## 参考文献

[1] 罗秋水, 杜华英, 熊建华, 等. 葛根异黄酮类化合物提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 中国食品学报, 2015,

- 15(2): 104-110.
- [2] 尹乐斌, 夏秋良, 赵良忠, 等. 葛根药理作用研究进展[J]. 现代农业科技, 2016(4): 68-69, 75.
- [3] 迟霁菲, 张国刚, 李萍, 等. 安徽产葛根的化学成分研究[J]. 中国药物化学杂志, 2007, 17(1): 47-49.
- [4] Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J. and Goodman, R.M. (1998) Molecular Biological Access to the Chemistry of Unknown Soil Microbes: A New Frontier for Natural Products. *Chemistry & Biology*, **5**, R245-R249. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(98\)90108-9](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(98)90108-9)
- [5] Zhang, H. and Cui, H.Z. (2010) Metagenomics and Its Research Progress. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*.
- [6] 史亮. 流式细胞仪的发展历史及其原理和应用进展研究[J]. 中国设备工程, 2021(12): 13-14.
- [7] 郭慧玲. 肠道菌群与疾病关系的研究进展[J]. 微生物学通报, 2015, 48(22): 400-410.
- [8] Balzola, F., Bernstein, C., Ho, G.T., *et al.* (2010) A Human Gut Microbial Gene Catalogue Established by Metagenomic Sequencing: Commentary.
- [9] Zackular, J.P., *et al.* (2013) The Gut Microbiome Modulates Colon Tumorigenesis. *Mbio*, **4**, e00692. <https://doi.org/10.1128/mBio.00692-13>
- [10] 康永波, 孔祥阳, 张晓芳, 郭丽琼, 苏君鸿. 肠道微生物与免疫的研究进展[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2016, 42(3): 282-288.
- [11] Xia, L., *et al.* (2007) Increased Susceptibility to Colitis and Colorectal Tumors in Mice Lacking Core 3-Derived O-glycans. *Journal of Experimental Medicine*, **204**, 1417-1429. <https://doi.org/10.1084/jem.20061929>
- [12] Fu, J., *et al.* (2011) Loss of Intestinal Core 1-Derived O-glycans Causes Spontaneous Colitis in Mice. *Journal of Clinical Investigation*, **121**, 1657-1666. <https://doi.org/10.1172/JCI45538>
- [13] Heazlewood, C.K., *et al.* (2008) Aberrant Mucin Assembly in Mice Causes Endoplasmic Reticulum Stress and Spontaneous Inflammation Resembling Ulcerative Colitis. *PLOS Medicine*, **5**, e54.
- [14] 王珊珊, 王佳堃, 刘建新. 肠道微生物对宿主免疫系统的调节及其可能机制[J]. 动物营养学报, 2015, 27(2): 375-382.
- [15] Kobozev, I., Karlsson, F. and Grisham, M.B. (2010) Gut-Associated Lymphoid Tissue, T Cell Trafficking, and Chronic Intestinal Inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1207**, E86-E93. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05711.x>
- [16] Maynard, C.L., Elson, C.O., Hatton, R.D., *et al.* (2012) Reciprocal Interactions of the Intestinal Microbiota and Immune System. *Nature*, **489**, 231-241. <https://doi.org/10.1038/nature11551>
- [17] 肖嫩群, 何云山, 张晨阳, 等. 葛根苓连汤对肠道湿热证腹泻小鼠肠道微生物的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2020, 32(10): 1140-1144.
- [18] 柏琳, 邹天琪, 张成义. 葛根总黄酮对佐剂性关节炎大鼠免疫器官指数, IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  的影响分析[J]. 吉林医学, 2021, 42(6): 1298-1300.
- [19] 赵赶, 何冠兰, 卢春远, 等. 骨碎补总黄酮对免疫低下模型小鼠免疫功能的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(3): 438-445.
- [20] Atarashi, K., *et al.* (2011) Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous Clostridium Species. *Science (New York, N.Y.)*, **331**, 337-341. <https://doi.org/10.1126/science.1198469>
- [21] Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., *et al.* (2016) Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous Clostridium Species. *Science*, **331**, 337-341.
- [22] Ivanov, I.I., *et al.* (2009) Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. *Cell*, **139**, 485-498. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.033>
- [23] Geuking, M., *et al.* (2011) Intestinal Bacterial Colonization Induces Mutualistic Regulatory T Cell Responses. *Immunity*, **34**, 794-806. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.021>
- [24] Moulin, D., Salem, F., Kindt, N., *et al.* (2019) Gut Microbiome in Chronic Rheumatic and Inflammatory Bowel Diseases: Similarities and Differences. *United European Gastroenterology Journal*, **7**, 1008-1032.
- [25] Huang, W., *et al.* (2017) Short-Chain Fatty Acids Inhibit Oxidative Stress and Inflammation in Mesangial Cells Induced by High Glucose and Lipopolysaccharide. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, **125**, 98-105. <https://doi.org/10.1055/s-0042-121493>
- [26] Macpherson, A.J. and Uhr, T. (2004) Induction of Protective IgA by Intestinal Dendritic Cells Carrying Commensal Bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, **303**, 1662-1665. <https://doi.org/10.1126/science.1091334>
- [27] Macpherson, A.J. and Slack, E. (2007) The Functional Interactions of Commensal Bacteria with Intestinal Secretory

- 
- IgA. *Current Opinion in Gastroenterology*, **23**, 673-678. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e3282f0d012>
- [28] Kverka, M., *et al.* (2011) Oral Administration of *Parabacteroides distasonis* Antigens Attenuates Experimental Murine Colitis through Modulation of Immunity and Microbiota Composition. *Clinical & Experimental Immunology*, **163**, 250-259. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04286.x>
- [29] Yee, K.G., Kane, A.V., Xian, W., *et al.* (2020) *Parabacteroides distasonis* Attenuates Tumorigenesis, Modulates Inflammatory Markers and Promotes Intestinal Barrier Integrity in Azoxymethane-Treated A/J Mice. *Carcinogenesis*, **41**, 909-917.
- [30] Koh, G.Y., Kane, A., Lee, K., *et al.* (2018) *Parabacteroides distasonis* Attenuates Toll-Like Receptor 4 Signaling and Akt Activation and Blocks Colon Tumor Formation in High-Fat Diet-Fed Azoxymethane-Treated Mice. *International Journal of Cancer*, **143**, 1797-1805. <https://doi.org/10.1002/ijc.31559>
- [31] 郭琳, 耿燕, 岳远佳, 等. 猴头菌粉与 5-氨基水杨酸联用抑制小鼠急性溃疡性结肠炎并提高肠道共生菌 *Parabacteroides distasonis*[J]. 菌物学报, 2021, 40(5): 1148-1159.