

黄芪多糖通过调节肠道菌群抑制高脂饮食小鼠肠道炎症反应

张竞男¹, 苑红¹, 马春丽¹, 李丽¹, 徐宋瑶¹,
张俊锋¹, 霍达¹, 任贵强², 扈瑞平^{*1}

(1. 内蒙古医科大学 基础医学院, 内蒙古 呼和浩特 010110; 2. 内蒙古医科大学 护理学院, 内蒙古 呼和浩特 010110)

摘要: 为考察黄芪多糖(APS)通过调节肠道菌群对高脂饮食引起的肠道慢性炎症的治疗作用, 选取 30 只 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组(C, 正常饮食)、模型组(M, 高脂饮食)、黄芪多糖处理组(D, 高脂饮食并给予 2 g/dL 黄芪多糖溶液), 每组 10 只, 于第 11 周取血清, 剥离脾脏、肾脏周围脂肪组织并称质量。收集小鼠粪便用于 16S rRNA 高通量测序。ELISA 检测血清 TC、TG、IgA、IgG、IgM、LPS、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平。结果表明, APS 增加拟杆菌门相对丰度, 降低厚壁菌门相对丰度, 升高拟杆菌门与厚壁菌门比值, 增加双歧杆菌相对丰度, 降低脂多糖(LPS)水平, 减少炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的释放, 提高脾脏指数, 促进 IgA、IgG、IgM 分泌。由此推测黄芪多糖能够调节肠道菌群结构, 增强小鼠免疫功能, 抑制 LPS 引起的肠道炎症。

关键词: 黄芪多糖; 肠道菌群; 高脂饮食; 炎症因子

中图分类号: R 285.5 文章编号: 1673-1689(2022)04-0019-06 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.04.003

Experimental Investigation on Inhibitory Effect of *Astragalus* Polysaccharides on Intestinal Inflammation in High-Fat Diet Mice by Intestinal Flora Regulation

ZHANG Jingnan¹, YUAN Hong¹, MA Chunli¹, LI Li¹, XU Songyao¹,
ZHANG Junfeng¹, HUO Da¹, REN Guiqiang², HU Ruiping^{*1}

(1. School of Basic Medicine, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China; 2. School of Nursing, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China)

Abstract: The therapeutic effect of *Astragalus* polysaccharides (APS) on chronic intestinal inflammation caused by high fat diet through regulating intestinal flora was investigated. Thirty C57BL/6J mice were randomly divided into three groups including the control group (C, fed with normal diet), the model group (M, fed with high fat diet) and APS group (D, fed with high-fat diet and 2 g/dL APS solution), with 10 mice in each group. The serum was collected at week 11, and the

收稿日期: 2021-07-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(32060217); 内蒙古科技计划项目(2019GG160); 第“十一批”草原英才工程, 内蒙古道地蒙药材免疫活性多糖制备及其构效关系研究创新人才团队项目; 内蒙古蒙医药协同创新项目(MYYXT201901); 内蒙古医科大学“三位一体”大学生创新创业培育项目(SWYT2020035)。

*** 通信作者:** 扈瑞平(1971—), 女, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事抗肿瘤免疫等研究。E-mail: 783674348@qq.com

adipose tissue around the spleen and kidney was stripped and weighed. The mice faeces were collected for 16S rRNA high-throughput sequencing. The levels of TC, TG, IgA, IgG, IgM, LPS, IL-1 β , IL-6 and TNF- α in serum were detected by ELISA. The results showed that APS promoted the abundance of Bacteroidota, decreased the abundance of Firmicutes, increased the ratio of Bacteroidota to Firmicutes, and increased the abundance of *Bifidobacterium*. It reduced the level of LPS and decreased the release of inflammatory cytokines including IL-1 β , IL-6 and TNF- α . It improved spleen index and promoted the secretion of IgA, IgG and IgM. It is thus speculated that APS could regulate the structure of intestinal flora, enhance the immune function of mice, and inhibit LPS-induced intestinal inflammation.

Keywords: *Astragalus* polysaccharides, intestinal flora, high fat diet, inflammatory cytokines

进入互联网时代,伴随人们生活方式的改变和不良饮食习惯的影响,肥胖、糖尿病、脂肪肝、动脉粥样硬化等代谢性疾病的发病率逐渐上升,已经成为威胁大众健康的普遍公共卫生问题。代谢性疾病的主要发病原因是营养物质代谢过剩诱发的慢性炎症反应^[1]。近年来许多研究证实肠道菌群与代谢、炎症反应、免疫功能等密切相关,并参与脂代谢等生理过程^[2-4]。

植物多糖的膳食干预可通过调节肠道菌群结构或多样性,发挥减轻炎症反应、调节血脂代谢等作用^[5]。黄芪多糖(APS)是黄芪主要活性成分之一,作为免疫增强剂在抗肿瘤、抗病毒等方面具有免疫调节作用^[6-7];能够有效调节血脂水平并改善胰岛素抵抗,发挥控制血糖、改善心血管功能的作用^[8-9]。作者给高脂饮食小鼠自由饮用黄芪多糖溶液,通过考察小鼠血清炎症因子和肠道菌群的变化,探究黄芪多糖是否可通过调节肠道菌群改善其肠道炎症反应。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

黄芪多糖(质量分数 70%):上海易恩化学技术有限公司产品;30 只 C57BL/6J 雄性小鼠:北京斯贝福生物技术有限公司提供;总胆固醇(TC)含量测定试剂盒、甘油三酯(TG)含量检测试剂盒、小鼠脂多糖(LPS)ELISA 试剂盒、小鼠免疫球蛋白 A(IgA) ELISA 试剂盒、小鼠免疫球蛋白 M(IgM)ELISA 试剂盒、小鼠免疫球蛋白 G(IgG)ELISA 试剂盒、小鼠白细胞介素-1 β (IL-1 β)ELISA 试剂盒、小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA 试剂盒、小鼠白细胞介素-6(IL-6)ELISA 试剂盒:江苏酶免实业有限公司;

正庚烷、异丙醇(均为分析纯):西陇科学股份有限公司产品。

1.2 仪器与设备

Forma 900 series 超低温冰箱、Multiskan FC 酶标仪:赛默飞世尔科技有限公司产品;DNP 型恒温培养箱:精宏科技有限公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型制备及分组 将 C57BL/6J 小鼠适应性喂养 7 d,随机分为对照组(C)、模型组(M)、黄芪多糖处理组(D),每组 10 只。对照组喂标准饲料和饮用水,模型组喂高脂饲料和饮用水,黄芪多糖处理组喂高脂饲料和 2 g/dL 黄芪多糖溶液。连续喂养 11 周后采样。

1.3.2 样本采集和处理 取样前 12 h 禁食,收集小鼠粪便于离心管中用于高通量测序,记录小鼠体质量。采用断头法取血于离心管中,静置 30 min,于 4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 15 min,分离血清。迅速剥离脾脏、肾脏周围脂肪组织,并称质量。

1.3.3 血脂、LPS、炎症因子、免疫球蛋白指标的测定 根据试剂盒说明测定血清样本中的 TC 浓度、TG 质量浓度,根据 ELISA 试剂盒说明测定血清样本中 LPS 水平,根据 ELISA 试剂盒说明测定血清样本中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 质量浓度,根据 ELISA 试剂盒说明测定血清样本中 IgA、IgG、IgM 质量浓度。

1.3.4 肠道菌群分析 采用 CTAB/SDS 方法提取总细菌基因组 DNA。选用上游引物 515F(5'-GTGCC AGCMGCCGCGGTAA-3')和下游引物 806R(5'-GG ACTACHVGGGTWTCTAAT-3')扩增细菌 16S rRNA 的 V3~V4 区。

1.4 统计学处理

实验结果以均值 $\pm$ 标准差的形式表示,数据采

用 SPSS 25.0 进行处理,用 Bonferroni 法进行方差分析,分析组间差异,认为 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。高通量测序结果采用 OTUs 聚类分析法,进行物种注释及丰度分析。

2 结果与分析

2.1 APS 对体质量、脂肪质量、脾脏指数的影响

表 1 为饲喂 APS 后小鼠体质量、脂肪质量、脾脏指数的变化。与对照组比较,模型组小鼠体质量增加 9.69%,脂肪质量增加($P<0.01$),脾脏指数降低($P<0.05$);与模型组相比,黄芪多糖干预后小鼠体质量增加,脂肪质量减少,脾脏指数升高接近对照组小鼠,但均无明显差异。

表 1 各组小鼠的体质量、脂肪质量、脾脏指数比较

Table 1 Comparison of the weight,the weight of fat and spleen index among the three groups

组别	<i>n</i>	体质量/g	脂肪质量/g	脾脏指数/%
C	10	25.80±2.38	0.06±0.04	27.09±4.93
M	10	28.30±2.83	0.34±0.11 ^{##}	22.77±1.42 [#]
D	10	29.20±1.92	0.28±0.08	26.14±3.29

注:与对照组比较,#代表 $P<0.05$,##代表 $P<0.01$;与模型组比较,*代表 $P<0.05$,**代表 $P<0.01$;全文中图注注相同。

2.2 APS 对血脂水平的影响

APS 对实验小鼠血脂水平的影响如图 1 所示。由图可知,与对照组相比,模型组总胆固醇、甘油三酯水平明显升高($P<0.01$),说明高脂饮食喂养后小鼠脂质代谢发生异常;与模型组相比,黄芪多糖处理组血清总胆固醇浓度明显降低($P<0.01$)。这说明 APS 显著改善了高脂饮食小鼠的总胆固醇异常状态。

2.3 APS 对血清中 LPS 水平的影响

APS 对实验小鼠血清 LPS 水平的影响如图 2 所示。与对照组相比,模型组 LPS 水平显著升高($P<0.01$);与模型组相比,黄芪多糖处理组 LPS 水平显著降低($P<0.01$)。说明 APS 能够降低因高脂饮食引起的 LPS 水平升高。

2.4 APS 对血清免疫球蛋白质量浓度的影响

APS 对实验小鼠血清免疫球蛋白质量浓度的影响如图 3 所示。与对照组相比,模型组 IgA、IgG、IgM 质量浓度降低,其中 IgA、IgG 有显著性差异($P<0.05$)。与模型组相比,黄芪多糖处理组小鼠血清 IgA、IgG、IgM 质量浓度升高,但无统计学意义。高脂

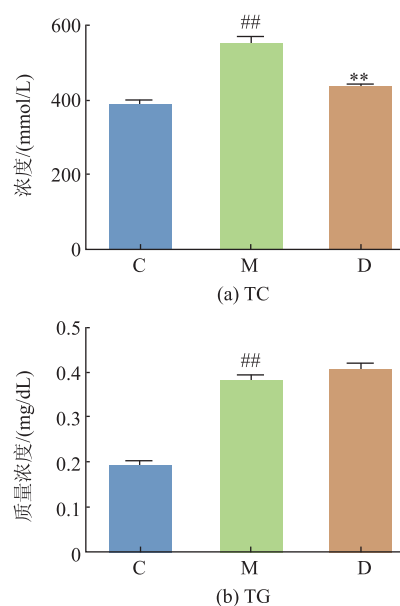


图 1 APS 对血脂水平的影响

Fig. 1 Effect of APS on plasma indexes

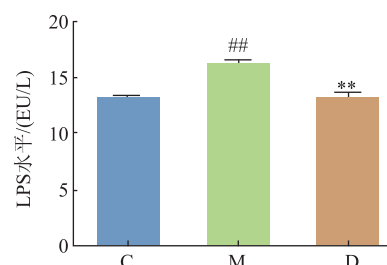
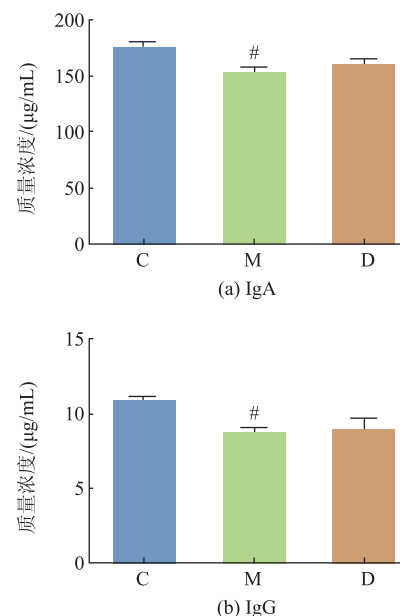


图 2 APS 对内毒素 LPS 水平的影响

Fig. 2 Effect of APS on LPS

饮食影响血清中免疫球蛋白的质量浓度,摄入 APS 能够增加血清中免疫球蛋白质量浓度。



RESEARCH ARTICLE

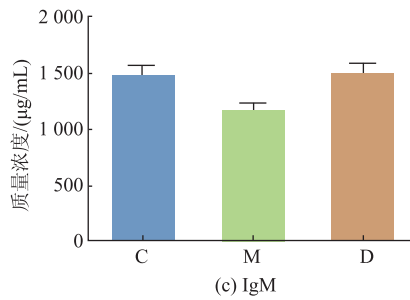


图3 APS对血清免疫球蛋白质量浓度的影响

Fig. 3 Effect of APS on serum immunoglobulin level

2.5 APS对炎症因子质量浓度的影响

APS对实验小鼠血清炎症因子质量浓度的影响如图4所示。与对照组相比,模型组 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 质量浓度均升高,其中 IL-1 β 、IL-6 差异明显 ($P<0.01$);与模型组相比,黄芪多糖处理组的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 质量浓度均降低,其中 IL-1 β 质量浓度有显著性差异 ($P<0.01$)。高脂饮食导致血清炎症因子增多,而 APS 可以降低血清中炎症因子质量浓度,尤其是 IL-1 β 的质量浓度。

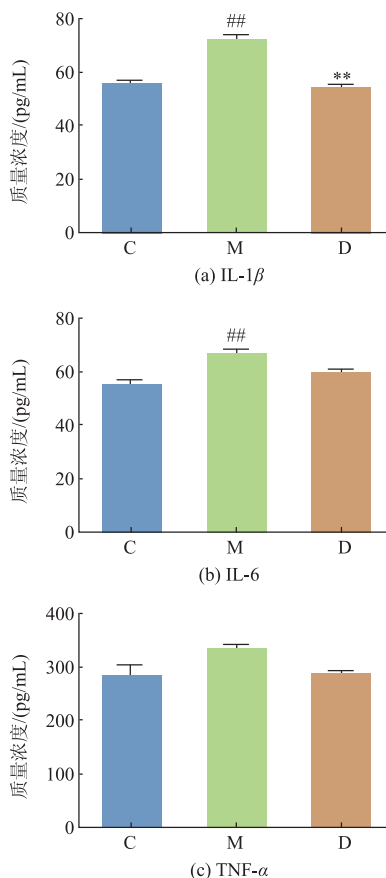


图4 APS对炎症因子质量浓度的影响

Fig. 4 Effect of APS on the level of inflammatory factors

2.6 APS对肠道菌群的影响

如图5和表2所示,与对照组比较,模型组小鼠肠道内的有益菌拟杆菌门(Bacteroidota)相对丰度下降 ($P<0.05$),有害菌厚壁菌门(Firmicutes)相对丰度增加,且拟杆菌门与厚壁菌门比值减小,但差异不明显。与模型组小鼠相比,黄芪多糖干预后,拟杆菌门相对丰度有所增加,厚壁菌门相对丰度有下降趋势,拟杆菌门与厚壁菌门比值升高,但差异不显著。说明长期高脂膳食会破坏小鼠肠道门水平上的菌群比例,引起小鼠肠道菌群紊乱,APS可调节高脂膳食导致的菌群结构失调。

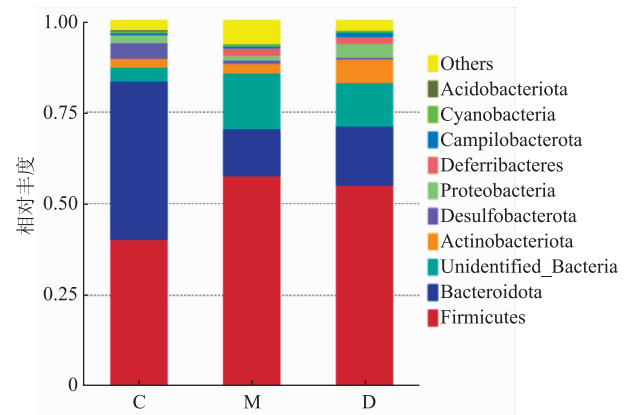


图5 门水平上各组小鼠含量前10的菌群物种相对丰度

Fig. 5 Relative abundance of top 10 bacterial species of mice in each group at phylum level

表2 黄芪多糖对肥胖小鼠肠道拟杆菌门、厚壁菌门相对丰度的影响

Table 2 Effect of APS on relative abundance of Bacteroidota and Firmicutes in the obese mice

组别	n	相对丰度		拟杆菌门与厚壁菌门比值
		拟杆菌门	厚壁菌门	
C	3	0.43±0.13	0.40±0.12	1.20±0.68
M	3	0.13±0.07 [#]	0.58±0.08	0.24±0.15
D	3	0.16±0.09	0.55±0.05	0.30±0.18

如图6所示,在属水平,对照组以 *Jeotgalicoccus*、*Desulfovibrio*、*Dubosiella* 为主,其中 *Jeotgalicoccus*、*Dubosiella* 属于厚壁菌门, *Desulfovibrio* 属于 Desulfobacterota; 模型组以 *Lachnospiraceae*、*NK4A136_group*、*Lactobacillus*、*Colidextribacter*、*Intestinimonas* 为主,均属于厚壁菌门;黄芪多糖处理组以 *Ileibacterium*、*Bifidobacterium*、*Psychrobacter*

为主,其中 *Ileibacterium* 属于厚壁菌门, *Bifidobacterium* 属于放线菌门(Actinobacteriota), *Psychrobacter* 属于变形菌门(Proteobacteria)。与对照组相比,模型组小鼠以厚壁菌门为优势菌群,说明高脂饮食改变肠道菌群结构;黄芪多糖干预后,可改善因高脂饮食导致的菌群失调,而且增加有益菌双歧杆菌(*Bifidobacterium*)相对丰度。

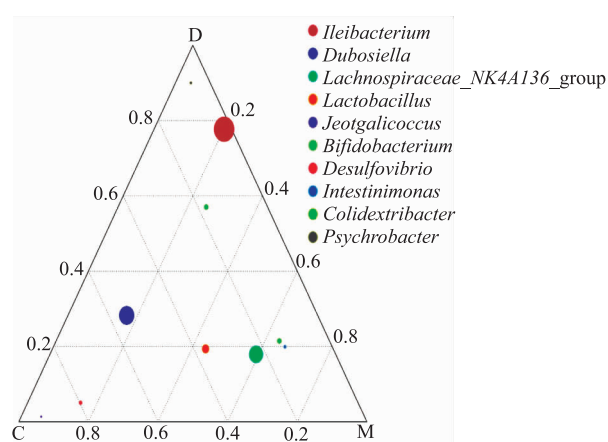


图 6 属水平上各组小鼠肠道菌群比例的三元图

Fig. 6 Ternary plot of the proportion of intestinal flora in each group at genus level

2.7 讨论

研究表明,长期高脂饮食可以持续改变肠道微生态^[10],肠道菌群结构失衡,引起致病菌数量增加,增加内毒素产生,影响肠上皮细胞的基因表达,使肠黏膜通透性增加^[11-12],内毒素进入血液循环,激活TLRs(Toll样受体)家族中TLR4,触发炎症信号通路^[13]。除此之外,脂肪组织中的NLRs(NOD样受体)信号通路通常处于激活状态^[14],其中NLRP3以炎性小体的形式,促进内源性和外源性危险信号转化为IL-1。大量研究提示巨噬细胞是脂肪组织中最主要的炎症细胞^[15],脂代谢异常时巨噬细胞向M1型巨噬细胞极化^[16],分泌IL-6、TNF- α 等炎症因子,诱发

持续的慢性炎症反应,导致机体代谢紊乱^[17-18]。本实验中黄芪多糖能够在门水平上增加拟杆菌门相对丰度,降低厚壁菌门相对丰度,升高拟杆菌门与厚壁菌门比值。增加的拟杆菌门可以将植物中的糖类物质分解为益生元,减轻炎症^[19];拟杆菌门与厚壁菌门比值的上升直接影响肠道菌群对膳食纤维的代谢,使短链脂肪酸(Short chain fatty acid, SCFAs)浓度升高,SCFAs可以诱导肠道中调节性T细胞产生和分化,从而促进抑炎因子IL-10的产生,发挥抗炎作用^[20-21]。在属水平上有益菌双歧杆菌属增多,能够改善小鼠内毒素血症^[22],并对肠黏膜屏障具有保护作用^[23],降低LPS负荷,降低LPS增多触发的炎症信号通路,减少血清中促炎因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 质量浓度。表明黄芪多糖可以调节菌群结构,增加有益菌生长,对肠道慢性炎症起到抑制作用。

小鼠由于长期高脂饮食,造成能量过剩,这部分能量转化为脂肪储存在体内^[24]。当血浆中胆固醇浓度增高时,细胞膜胆固醇合成受抑制,从而使B淋巴细胞增殖和对抗原信息的识别功能受到限制,进而导致免疫球蛋白分泌减少^[25]。黄芪多糖作为中药黄芪的活性成分,既可以在免疫低下时提高机体免疫力,又可以在炎症持续时,降低炎症水平^[26]。本研究中黄芪多糖可通过提高免疫器官脾脏指数,促进免疫球蛋白分泌,增强小鼠免疫功能,降低炎症因子水平。已有文献报道,临床常用药物二甲双胍可以降低血清炎症因子IL-6、TNF- α 和IL-1 β 水平^[27],抑制炎症发展^[28-30]。

3 结 语

黄芪多糖能够调节高脂饮食小鼠肠道菌群结构,增强小鼠免疫功能,抑制LPS引起的肠道炎症,改善脂代谢异常。黄芪多糖与二甲双胍在抑制肠道炎症方面具有相似功效,为将其开发作为预防或治疗代谢性疾病的保健品或药物提供实验依据。

参考文献:

- [1] HOTAMISLIGIL G S. Inflammation and metabolic disorders[J]. *Nature*, 2006, 444(7121): 860-867.
- [2] ZHONG C Y, SUN W W, MA Y, et al. Microbiota prevents cholesterol loss from the body by regulating host gene expression in mice[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 1-12.
- [3] SAYIN S, WAHLSTR M A, FELIN J, et al. Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist[J]. *Cell Metabolism*, 2013, 17(2): 225-235.

- [4] NIE Y F, HU J, YAN X H. Cross-talk between bile acids and intestinal microbiota in host metabolism and health[J]. **Journal of Zhejiang University-Science B**, 2015, 16(6):436-446.
- [5] NIE Q X, CHEN H H, HU J L, et al. Effects of nondigestible oligosaccharides on obesity[J]. **Annual Review of Food Science and Technology**, 2020, 11:205-233.
- [6] 李树颖, 秦雪梅, 李科, 等. 黄芪多糖免疫调节作用及其机制研究进展[J]. 山西医科大学学报, 2019, 50(5):685-689.
- [7] 王玥, 杨志国, 王艳华, 等. 黄芪多糖与人参多糖免疫调节作用的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(3):891-897.
- [8] 魏祎. 黄芪多糖对肥胖模型大鼠胰岛素抵抗的作用研究[J]. 河南中医, 2021, 41(4):562-565.
- [9] 陈蔚, 鞠婧, 孙奇林, 等. 黄芪多糖改善 db/db 糖尿病肥胖小鼠心肌脂毒性的机理研究[J]. 国际心血管病杂志, 2018, 45(2):79-83.
- [10] HUSSAIN M, BONILLA-ROSSO G, KWONG C C K C, et al. High dietary fat intake induces a microbiota signature that promotes food allergy[J]. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2019, 144(1):157-170.
- [11] ZHAO L. The gut microbiota and obesity: from correlation to causality[J]. **Nature Reviews Microbiology**, 2013, 11(9):639.
- [12] BASU S, HAGHIAC M, SURACE P, et al. Pregravid obesity associates with increased maternal endotoxemia and metabolic inflammation[J]. **Obesity**, 2010, 19(3):476-482.
- [13] NGUYEN M T, FAVELYUKIS S, NGUYEN A K, et al. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by FFAS via TLR2, TLR4 and JNK-dependent pathways[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2007, 282(48):35279-35292.
- [14] LAMKANFI M, MUELLER J L, VITARI A C, et al. Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome[J]. **Journal of Cell Biology**, 2009, 187(1):61-70.
- [15] ROHM T V, FUCHS R, MÜLLER R L, et al. Obesity in humans is characterized by gut inflammation as shown by pro-inflammatory intestinal macrophage accumulation[J]. **Frontiers in Immunology**, 2021, 12:1-15.
- [16] LUMENG C N, BODZIN J L, SALTIEL A R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization[J]. **Journal of Clinical Investigation**, 2007, 117(1):175-184.
- [17] MIYAMOTO J, IGARASHI M, WATANABE K, et al. Gut microbiota confers host resistance to obesity by metabolizing dietary polyunsaturated fatty acids[J]. **Nature Communications**, 2019, 10(1):1-15.
- [18] NATIVIDAD J M, BRUNO L, PHUONG P H, et al. *Bilophila wadsworthia* aggravates high fat diet induced metabolic dysfunctions in mice[J]. **Nature Communications**, 2018, 9(1):1-15.
- [19] GOULET O. Potential role of the intestinal microbiota in programming health and disease[J]. **Nutrition Reviews**, 2015, 73(1):32-40.
- [20] 俞昊男, 刘志华. 肠道微生物与黏膜免疫研究的前沿进展[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(16):1921-1930.
- [21] 戴新新, 蔡红蝶, 宿树兰, 等. 地黄叶对糖尿病肾病大鼠肠道菌群的调节作用[J]. 药学报, 2017, 52(11):1683-1691.
- [22] ANGELAKIS E, MERHEJ V, RAOULT D. Related actions of probiotics and antibiotics on gut microbiota and weight modification[J]. **Lancet Infectious Diseases**, 2013, 13(10):889-899.
- [23] 张静. 有氧运动与复合植物多糖对高脂膳食诱导肥胖大鼠肠道菌群的影响与机制研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2016.
- [24] MARCOS A, NOVA E, MONTERO A. Changes in the immune system are conditioned by nutrition[J]. **European journal of clinical nutrition**, 2003, 57(1):66-69.
- [25] 樊丽莎, 刘煜. B 淋巴细胞在糖尿病、肥胖中作用的研究进展[J]. 中国实验诊断学, 2016, 20(1):166-169.
- [26] 周悦芳, 范培红. 中药免疫调节作用研究进展[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(1):204-207.
- [27] 李天艺, 李华, 焦文君, 等. 二甲双胍对老年 2 型糖尿病炎症和肠道菌群失衡的临床疗效研究[J]. 中华老年医学杂志, 2018, 37(8):879-882.
- [28] LEE S Y, LEE S H, YANG E J, et al. Metformin ameliorates inflammatory bowel disease by suppression of the STAT3 signaling pathway and regulation of the between Th17/Treg balance[J]. **PLoS One**, 2015, 10(9):1-12.
- [29] KOH S J, KIM J M, KIM I K, et al. Anti-inflammatory mechanism of metformin and its effects in intestinal inflammation and colitis-associated colon cancer[J]. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, 2014, 29(3):502-510.
- [30] DENG J, ZENG L, LAI X, et al. Metformin protects against intestinal barrier dysfunction via AMPK α 1-dependent inhibition of JNK signalling activation[J]. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 2018, 22(1):546-557.