



合生元益生菌冲剂对小鼠肠道菌群调节作用的研究

黄小琼, 刘盛来, 郑佳林, 黄虹坤, 黄小红, 饶子亮, 钟志勇, 唐小江

(广东省医学实验动物中心, 佛山 528248)

【摘要】 目的 研究合生元益生菌冲剂对小鼠肠道菌群的调节作用。方法 将小鼠分为阴性对照组、合生元益生菌冲剂组。阴性对照组灌服蒸馏水 14 d, 合生元益生菌冲剂组灌服 1 g/kg·d 剂量的合生元益生菌冲剂 14 d, 检测实验前后肠道菌群数量。结果 灌服后小鼠肠道菌群与灌服前比较, 双歧杆菌数量有显著性增加 ($P < 0.05$)。肠杆菌、肠球菌、乳杆菌和产气荚膜梭菌数量有无显著性变化 ($P > 0.05$)。结论 合生元益生菌冲剂对小鼠肠道菌群具有一定的调节作用。

【关键词】 合生元益生菌冲剂; 小鼠; 肠道菌群;

【中图分类号】 R392.5; R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)10-11-0127-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.10.11.029

The Effect of BIOSTIME Probiotics on Mouse Normal Intestinal Microflora

HUANG Xiao-qiong, LIU Sheng-lai, ZHENG Jia-lin, HUANG Hong-kun, HUANG Xiao-hong,
RAO Zi-liang, ZHONG Zhi-yong, TANG Xiao-jiang
(Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Foshan 528248, China)

【Abstract】 Objective To observe the regulatory effect of BIOSTIME probiotics on intestinal flora. **Method** Mice were divided into normal control group, BIOSTIME probiotics group. Control group fed with distilled water for 14 d. The BIOSTIME probiotics group fed with BIOSTIME probiotics for 14 d. The numbers of intestinal flora before and after experiments were detected. **Result** The numbers of intestinal Bifidobacterium of the groups fed with BIOSTIME probiotics superior to those of normal control group ($P < 0.05$), while the number of *E. coli*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Clostridium perfringens* was not significantly changed ($P > 0.05$), compared with the data prior of feeding. **Conclusion** BIOSTIME has a regulatory effect on mouse intestinal flora.

【Key words】 BIOSTIME probiotics; Mice; Intestinal flora

微生态研究表明,肠道微生物是人类健康和疾病的重要决定因素。乳杆菌和双歧杆菌为肠道益生菌,能调节肠道微生态平衡,参与营养物质代谢,构建免疫防御系统,对保证人体健康,预防疾病具有重要作用。肠道内由于这些有益菌的存在,使碳水化合物分解产生多种有机酸,而且不产生任何有毒的代谢产物,因此提高了机体的消化机能,促进营养物质的吸收,并且竞争性地抑制某些入侵的病原菌或抑制肠道内有害菌的增殖^[1]。因此,保持肠道有益菌群的数量是宿主保持健康的关键因素。合生元益生菌冲剂(儿童型)由嗜酸乳杆菌、两歧双

歧杆菌、婴儿双歧杆菌、低聚果糖、麦芽糊精、香兰素等组成的保健食品,具有免疫调节的保健功能。该品是上市多年的保健品,为临床使用和调节肠道菌群相关方面实验研究进一步提供安全有效的实验证据,笔者对合生元益生菌冲剂调节肠道菌群作用进行实验研究,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 动物来源:

选用健康的 SPF 级 BALB/C 小鼠 20 只,雄性,体重 18 ~ 22 g。由广东省医学实验动物中心提供,

动物合格证号: 0085698。动物生产许可证号: SCXK(粤) 2008-0002, 经过中心实验动物伦理委员会批准。

1.2 主要实验仪器及检测试剂盒

1.2.1 实验仪器:

BS-3000A 电子天平, 上海友声衡器有限公司生产, 感量 0.1 g。智能生化培养箱: 型号: PHX-250, 生产厂家: 宁波莱福科技有限公司。全自动灭菌器: 型号: LMQ.C, 厂家: 山东新华医疗器械股份有限公司。电子分析天平: 型号: JJ1000, 厂家: 常熟市双杰测试仪器长。

1.2.2 实验药物及检测试剂:

1.2.2.1 实验药物: 法国合生元益生菌冲剂(儿童型): 合生元(广州)健康产品有限公司生产, 规格: 1.5 g/袋, 批号: 1001038。

1.2.2.2 主要检测试剂: 伊红美蓝琼脂: 批号: 1012105, 厂家: 北京陆桥技术有限责任公司。叠氮钠-结晶紫-七叶苷琼脂: 批号: 1003251, 厂家: 北京陆桥技术有限责任公司。BBL 琼脂: 批号: 100315, 厂家: 北京陆桥技术有限责任公司。Lbs 琼脂: 批号: 100929, 厂家: 北京陆桥技术有限责任公司。TSC 琼脂: 批号: 1009032, 厂家: 北京陆桥技术有限责任公司。麦氏比浊管: 批号: 10000198490, 厂家: 法国 biomerieux. sa, API50CH 培养基: 批号: 863703301, 厂家: 法国 biomerieux. sa, 碳水化合物鉴定试剂条 API50CH: 批号: 866264101, 厂家: 法国 biomerieux. sa。

1.2.3 实验方法^[2]

1.2.3.1 动物分组和给药方法:

将检疫合格的小鼠 20 只随机分为合生元益生菌冲剂组和阴性对照组, 每组 10 只。合生元益生菌冲剂组小鼠每天给予 1 g/kg·d 合生元益生菌冲剂 1 次/d, 连续给予 14 d, 阴性对照组给予生理盐水, 各组动物每天按 20 mL/kg 体重灌胃给药。

1.2.3.2 小鼠肠道菌群的检测

给予样品之前, 提起小鼠尾巴无菌环境下收集新鲜粪便 0.1 g, 装于事先灭菌的带玻璃珠 EP 管中, 加生理盐水 0.9 mL, 此为稀释度 10^{-1} , 立即将 EP 管封口。于振荡器上振荡 5 min, 使粪便均质化。将上述振荡好的标本进行 10 倍系列稀释至 10^{-5} 。选用 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-5} , 用 1 mL 注射器和灭菌吸头, 自高稀释度向低稀释度在相应的培养基上各滴加稀释液 50 μ L, 待接种好的培养基吸干后, 肠杆菌: 伊红美蓝培养基, 37 $^{\circ}$ C 24 h 需氧培养; 产气荚膜梭菌: TSC 培养基, 37 $^{\circ}$ C 48 h 厌氧培养; 肠球菌: 叠氮钠结晶紫七叶苷培养基, 37 $^{\circ}$ C 48h 需氧培养; 乳杆菌: LBS 培养基, 37 $^{\circ}$ C 48 h 培养; 双歧杆菌: BBL 培养基, 37 $^{\circ}$ C 48 h 厌氧培养。待菌落长出后, 以菌落形态、革兰染色、生化反应鉴定所需目的菌。培养好的细菌经鉴定后计算每克粪便中细菌数量(CFU·g $^{-1}$)。选择菌落适中的稀释度, 算出同一稀释度平均菌落数(X)。公式: CFU·g $^{-1}$ 标本 = X / 0.05 \times 稀释倍数 \times 1 / 标本质量(g)。结果用常用对数值 lgCFU·g $^{-1}$ 表示。最后一次给予合生元益生菌冲剂之后 24 h, 与实验前同样方法取直肠粪便, 检测肠道菌群, 方法同上。

2 统计方法

体重采用 SPSS16.0 软件进行重复资料方差分析($P > 0.05$), 菌群数量采用 *t* 检验统计。

3 结果

3.1 一般状态

阴性对照组、合生元益生菌冲剂组在给药期间均正常增长、精神状态等未见异常。

3.2 体重

合生元益生菌冲剂组小鼠的体重在给药第 7 天与阴性对照组比较均有显著性差异($P < 0.05$), 在给药第 14 天与阴性对照组比较无显著性差异($P > 0.05$), 详见表 1 及图 1。

表 1 合生元益生菌冲剂对小鼠体重结果的影响($\bar{x} \pm s$)
Tab. 1 Effect of BIOSTIME probiotics on body weight of mice($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	动物数 Number	测定时间 Test time		
		D0 First day	D7 7 days	D14 14 days
阴性对照组 Normal control group	10	20.6 \pm 1.0	22.1 \pm 1.5	25.0 \pm 0.9
合生元益生菌冲剂组 BIOSTIME probiotics group	10	20.4 \pm 0.8	23.1 \pm 0.6*	24.4 \pm 0.8

注 “*”表示用药组与阴性对照组比较有显著性差异 $P < 0.05$
Note: compared with control group, “*” $P < 0.05$

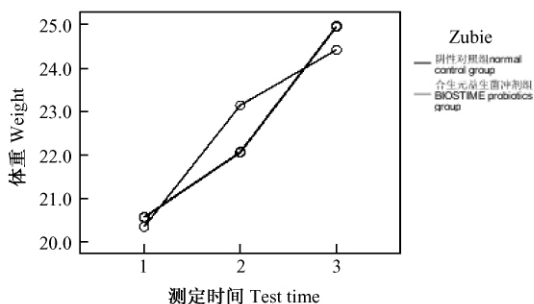


图 1 合生元益生菌冲剂对小鼠体重结果的影响

Fig. 1 Effect of BIOSTIME probiotics on body weight of mice

表 2 合生元益生菌冲剂对小鼠肠道菌群数量的影响 ($\log \bar{x} \pm s$)
Tab.2 Effect of BIOSTIME probiotics on intestinal flora of mice ($\log \bar{x} \pm s$)

检测项目 Test	处理 Process	阴性对照组 normal control group	合生元益生菌冲剂组 BIOSTIME probiotics group
肠杆菌 <i>E. coli</i>	灌胃前 Data before feeding	7.13 ± 0.27	7.15 ± 0.35
	灌胃后 Data after feeding	6.71 ± 0.81	6.71 ± 0.64
肠球菌 <i>Enterococcus</i>	灌胃前 Data before feeding	7.42 ± 0.24	7.45 ± 0.16
	灌胃后 Data after feeding	6.91 ± 1.00	7.10 ± 0.57
产气荚膜梭菌 <i>Clostridium perfringens</i>	灌胃前 Data Before feeding	6.23 ± 0.10	6.25 ± 0.14
	灌胃后 Data after feeding	5.88 ± 0.86	5.80 ± 0.86
乳杆菌 <i>Lactobacillus</i>	灌胃前 Data Before feeding	7.36 ± 0.18	7.40 ± 0.22
	灌胃后 Data after feeding	6.98 ± 0.60	7.04 ± 0.61
双歧杆菌 <i>Bifidobacterium</i>	灌胃前 Data Before feeding	9.33 ± 0.09	9.24 ± 0.14
	灌胃后 Data after feeding	9.36 ± 0.49	9.64 ± 0.46 ^Δ

注 “Δ”表示用药组灌胃前后自身比较有显著性差异 $P < 0.05$
Note: compared with gavage before and after the group, “Δ” $P < 0.05$

3.4 肠杆菌、肠球菌和双歧杆菌培养基上培养结果

肠杆菌在 EMB 培养基上长出黑紫色凸起菌落,有金属光泽肠球菌在叠氮钠结晶紫七叶苷培养基上长出有明显褐色圈菌落,双歧杆菌在 BBS 培养基上长出淡黄色凸起湿润的小菌落。见彩插 2(图 2)

3.5 API50CHI 乳杆菌的碳水化合物鉴定结果

49 项 API50CHI 乳杆菌的碳水化合物鉴定结果,均符合国标 GB/T4789 35-2010 有关乳杆菌的生化特性。见彩插 2(图 3)

4 讨论

人体体表、体腔内存在大量并不致病的微生物群,这些微生物群对其宿主非但无害,而且有益,并有众多的生理效应。若是内外环境发生重大变化时,致病微生物群与非致病微生物群之间的平衡就要遭到破坏,发生微生态失调,并引起宿主各种类型的疾病。人体微生态系统包括口腔、皮肤、泌尿、胃肠道四个微生态系统,以肠道微生态系统最为主要、复杂。人体消化道正常菌群包括乳酸杆菌

3.3 小鼠粪便肠杆菌、肠球菌、双歧杆菌、乳杆菌和产气荚膜梭菌 5 种菌群数量的检查

合生元益生菌冲剂组与阴性对照组比较肠杆菌、肠球菌、双歧杆菌、乳杆菌和产气荚膜梭菌 5 种菌群数量均无显著性变化 ($P > 0.05$),合生元益生菌冲剂组灌胃前后自身比较双歧杆菌数量有显著性增加 ($P < 0.05$),合生元益生菌冲剂组灌胃前后自身比较肠杆菌、肠球菌、乳杆菌和产气荚膜梭菌数量有无显著性变化 ($P > 0.05$)。详见表 2。

属、肠道球菌、肠杆菌和拟杆菌属等^[3]。双歧杆菌、乳杆菌是人肠道中有益菌的代表,主要通过降低肠道 PH 值、抑制韦永氏球菌、梭菌等腐败菌增殖,减少腐败物产生,同时也因 PH 下降对病原菌的生存、增殖很不利^[4]。

现有微生物制剂主要有益生菌、益生元和合生素^[4]。利用有益活菌制剂以及增殖促进剂,保证或调整有益的肠道菌群构成,从而收到特定的健康利益是当前国内外保健食品开发有效的、重要的领域。合生元益生菌冲剂是由嗜酸乳杆菌、两歧双歧杆菌、婴儿双歧杆菌等有益活菌制剂和低聚果糖、麦芽糊精等有益菌增殖促进剂综合研制而成。本实验研究表明,合生元益生菌冲剂(儿童型)可以增加小鼠体重、明显促进肠道益生菌双歧杆菌的增殖,进而增强对感染的抵抗力。现如今,抗生素在抗感染中的广泛应用是导致机体肠道正常菌群失衡的最重要原因之一。肠道菌群失调的病因除了原发于肠道的疾病和全身性疾病以外,还包括抗生素应用不合理、化疗和免疫功能低下等。我们通过

使用一定量的法国合生元益生菌冲剂,调整机体的免疫功能和营养状态,促进有益菌的增殖,证明了法国合生元益生菌冲剂对肠道菌群的调节作用。以上研究结果为临床使用合生元益生菌冲剂和相关方面实验研究,进一步提供安全有效的实验证据。但是,合生元益生菌冲剂对肠道微生物的定植抗力如何尚需进一步研究。

参考文献:

[1] 徐永杰,张波,张祎腾.牛蒡多糖的提取及对小鼠肠道菌群

的调节作用[J],食品科学营养卫生,2009,30(23):428-431.

[2] 中华人民共和国卫生部.保健食品检验与评价技术规范(2003年版)[S].

[3] 陈琛,江振友,宋克玉,等.中草药对小鼠肠道菌群影响的实验研究[J].中国微生态学杂志,2011,23(1):15-17

[4] 钟耀广主编.功能性食品[M],化学工业出版社,2004,(1)

(修回日期)2011-09-16

(上接第 135 页)

[5] Flatters SJ, Bennett GJ. Ethosuximide reverses paclitaxel-and vincristine-induced painful peripheral neuropathy [J]. Pain. 2004,109(1-2):150-161.

[6] Gauchan P, Andoh T, Kato A, Sasaki A, Kuraishi Y. Effects of the prostaglandin E1 analog limaprost on mechanical allodynia caused by chemotherapeutic agents in mice [J]. J Pharmacol Sci. 2009,109(3):469-472.

[7] Hidaka T, Shima T, Nagira K, Ieki M, Nakamura T, Aono Y, Kuraishi Y, Arai T, Saito S. Herbal medicine Shakuyaku-kanzo reduces paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy in mice [J]. Eur J Pain. 2009,13(1):22-27.

[8] Smith SB, Cramer SE, Mogil JS. Paclitaxel-induced neuropathic hypersensitivity in mice responses in 10 inbred mouse strains [J]. Life Sci. 2004,74(21):2593-2604.

[9] Flatters SJ, Xiao WH, Bennett GJ. Acetyl-L-carnitine prevents and reduces paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy [J]. Neurosci Lett. 2006,397(3):219-223.

[10] Jin HW, Flatters SJ, Xiao WH, Mulhern HL, Bennett GJ.

Prevention of paclitaxel-evoked painful peripheral neuropathy by acetyl-L-carnitine effects on axonal mitochondria, sensory nerve fiber terminal arbors [J]. Exp Neurol. 2008,210(1):229-237.

[11] Xiao WH, Bennett GJ. Chemotherapy-evoked neuropathic pain Abnormal spontaneous discharge in A-fiber and C-fiber primary afferent neurons and its suppression by acetyl-L-carnitine [J]. Pain. 2008,135(3):262-270.

[12] 陈治军,田玉科,罗放,曹菲,王平.紫杉醇致大鼠外周神经病理性疼痛模型的建立[J].华中科技大学学报(医学版),2008,37(6):785-790.

[13] Rahn EJ, Zvonok AM, Thakur GA, Khanolkar AD, Makriyannis A, Hohmann AG. Selective activation of cannabinoid CB2 receptors suppresses neuropathic nociception induced by treatment with the chemotherapeutic agent paclitaxel in rats [J]. J Pharmacol Exp Ther. 2008,327(2):584-591.

(修回日期)2011-09-19



a. 肠杆菌(EMB 培养基); b. 肠球菌(叠氮钠结晶紫七叶苷培养基); c. 双歧杆菌(BBS 培养基)

a. E.coli(EMB Medium); b. Enterococcus(Crystal violet sodium azide medium Aescin glycosides); c. Bifidobacterium(BS Medium)

图 2 肠杆菌、肠球菌和乳杆菌培养基上培养结果

Fig. 2 E.coli, Enterococcus end Lactobacillus Medium on the culture results



图 3 API50CHI 乳杆菌的碳水化合物鉴定结果

Fig. 3 API50CHI carbohydrates Lactobacillus identification results

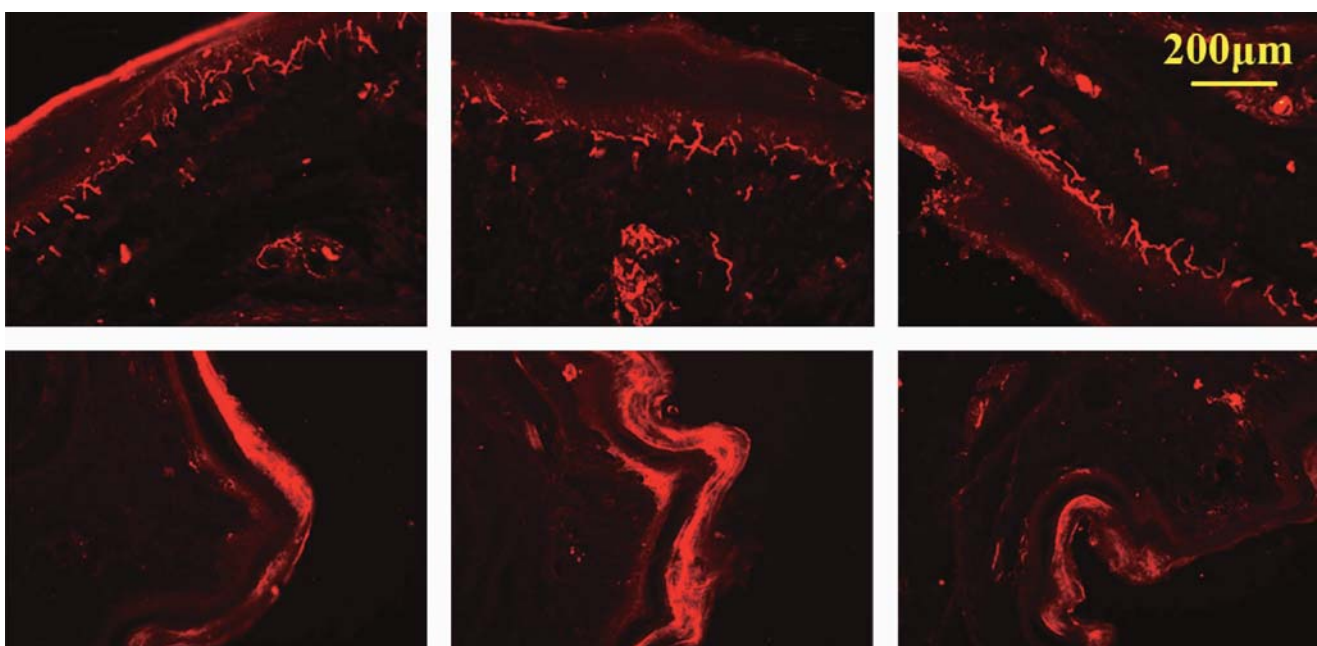


图 4 紫杉醇对 SD 大鼠 IENF 的影响。荧光显微镜检测 PGP9.5 标记的 SD 大鼠后足表皮下的 IENF,100× 每组观察 3 只 SD 大鼠。(A)对照组;(B) PTX 处理组