

# 蓝靛果多酚对免疫抑制小鼠调节肠道微生态的作用机制

张龄予<sup>1</sup>, 潘丽佳<sup>2</sup>, 侯苏芯<sup>2</sup>, 姜 珊<sup>2</sup>, 杨 梅<sup>2</sup>, 曹家桢<sup>3</sup>, 徐晓红<sup>3,\*</sup>, 张 楠<sup>1,\*</sup>  
(1. 长春中医药大学吉林省人参科学研究院, 吉林 长春 130117; 2. 长春中医药大学药学院, 吉林 长春 130117;  
3. 长春中医药大学针灸推拿学院, 吉林 长春 130117)

**摘要:** 目的: 探究蓝靛果多酚 (*Lonicera caerulea* berry polyphenols, LCBP) 对免疫抑制小鼠免疫活性和肠道菌群的影响。方法: 将32只小鼠随机分为空白对照组、模型组、LCBP低剂量组、LCBP高剂量组, 分别在17、19、21 d腹腔注射环磷酰胺80 mg/(kg  $m_b$  · d), 考察小鼠免疫相关脏器指数、血常规生化指标、结肠苏木精-伊红染色病理情况、肠道微生物多样性与分布、结肠内短链脂肪酸质量浓度的变化。结果: 与模型组比较, LCBP高剂量组小鼠的脾脏指数与胸腺指数极显著升高 ( $P < 0.01$ ); 白细胞、淋巴细胞、血小板水平较模型组显著升高 ( $P < 0.05$ ), 红细胞、中性粒细胞水平较模型组极显著升高 ( $P < 0.01$ ); LCBP提高了免疫抑制小鼠肠道内厚壁菌门、 $\epsilon$ -变形菌纲、变形菌门、狄氏副拟杆菌、放线菌门和蓝细菌门的相对丰度及短链脂肪酸质量浓度。结论: LCBP具有增加免疫抑制小鼠肠道菌群种类、调节肠道菌群结构分布、减轻免疫抑制导致的肠道损伤、增强免疫功能的作用。

**关键词:** 蓝靛果多酚; 免疫抑制; 免疫调节活性; 肠道菌群; 短链脂肪酸

## Mechanism of Action of *Lonicera caerulea* Berry Polyphenols in Regulating Intestinal Microecology in Immunosuppressive Mice

ZHANG Lingyu<sup>1</sup>, PAN Lijia<sup>2</sup>, HOU Suxin<sup>2</sup>, JIANG Shan<sup>2</sup>, YANG Mei<sup>2</sup>, CAO Jiazhen<sup>3</sup>, XU Xiaohong<sup>3,\*</sup>, ZHANG Nan<sup>1,\*</sup>

(1. Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

2. College of Pharmacy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

3. School of Acupuncture-Moxibustion and Tuina, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

**Abstract:** Objective: In order to explore the effects of *Lonicera caerulea* berry polyphenols (LCBP) on immunity and intestinal flora in immunosuppressive mice. Methods: Thirty-two mice were randomly divided into a blank control group, a model group, a low-dose LCBP group and a high-dose LCBP group. Cyclophosphamide at 80 mg/(kg  $m_b$  · d) was injected intraperitoneally after 17, 19 and 21 d of oral administration. Immune organ indices, routine blood biochemical indexes, intestinal microbial diversity and distribution, and the level of short chain fatty acids in colonic contents were investigated and colonic histopathology was examined by hematoxylin-eosin (HE) staining. Results: Compared with the model group, spleen and thymus indexes in the high-dose LCBP group significantly increased ( $P < 0.01$ ). Also, the number of white blood cells, lymphocytes and platelets increased ( $P < 0.05$ ), and so did the number of red blood cells and neutrophils ( $P < 0.01$ ). LCBP increased the relative abundance of Firmicutes, Epsilonbacteraeota, Proteobacteria, Patescibacteria, Actinobacteria and Cyanobacteria in the intestinal tract of immunosuppressive mice and the concentrations of fecal short-chain fatty acids

收稿日期: 2022-08-22

基金项目: 吉林省科技发展计划项目 (20210401099YY); 吉林省产业技术研究与开发专项 (2021C041-8);

吉林省大学生创新创业训练计划项目 (S202210199027); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (202110199038X)

第一作者简介: 张龄予 (1998—) (ORCID: 0000-0001-9770-6314), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药分析与检验方法。

E-mail: 2830540942@qq.com

\*通信作者简介: 徐晓红 (1978—) (ORCID: 0000-0001-6125-2904), 女, 副教授, 博士, 研究方向为特定穴配伍规律与临床。

E-mail: 740761229@qq.com

张楠 (1983—) (ORCID: 0000-0002-1684-4094), 女, 讲师, 博士, 研究方向为天然药物有效成分筛选及作用机制。E-mail: 893813198@qq.com

(SCFAs). Conclusion: LCBP can increase the type of intestinal flora, regulate the structural distribution of intestinal flora, alleviate intestinal injury and enhance immune function in immunosuppressive mice.

**Keywords:** *Lonicera caerulea* berry polyphenols (LCBP); immunosuppression; immunoregulatory activity; intestinal flora; short chain fatty acids (SCFAs)

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220822-264

中图分类号: TS201.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2023) 15-0147-09

引文格式:

张龄予, 潘丽佳, 侯苏芯, 等. 蓝靛果多酚对免疫抑制小鼠调节肠道微生态的作用机制[J]. 食品科学, 2023, 44(15): 147-155. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220822-264. <http://www.spkx.net.cn>

ZHANG Lingyu, PAN Lijia, HOU Suxin, et al. Mechanism of action of *Lonicera caerulea* berry polyphenols in regulating intestinal microecology in immunosuppressive mice[J]. Food Science, 2023, 44(15): 147-155. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220822-264. <http://www.spkx.net.cn>

肠道微生态系统是人体中重要的微生态系统, 具有种类多样、数量巨大的微生物群落, 其生物多样性和群落分布结构与宿主的饮食习惯、身体发育、免疫调节状态等方面相互影响。随着对肠道微生物环境研究的不断深入, 发现其与人体多种免疫性疾病密切相关<sup>[1]</sup>。许多代谢产物通过肠道菌群的多种代谢作用产生, 包括脂多糖、胆汁酸、色氨酸及其衍生物以及短链脂肪酸 (short-chain fatty acid, SCFAs)。这些代谢产物作用于免疫应答, 促进或者抑制宿主的免疫功能。肠道菌群与宿主的免疫功能之间具有较复杂的关联机制, 在免疫功能的调节中肠道菌群及其代谢产物发挥着重要作用<sup>[2-3]</sup>。但肠道微生物与宿主的免疫调节相互作用机制尚需要进一步的确认与深入探究。

蓝靛果 (*Lonicera caerulea* L. var. *edulis* Turcz. ex Herd.) 是一种忍冬科忍冬属蓝果忍冬的变种植物, 又名蓝靛果忍冬、黑瞎子果、山茄子果等。蓝靛果多酚 (*L. caerulea* berry polyphenols, LCBP) 是蓝靛果中一类重要的活性成分, 包括花青素类和花色苷类、酚酸类、黄酮-3-醇类、黄酮醇类、黄酮类化合物等<sup>[4]</sup>。研究显示, 蓝靛果具有保护心脏神经、抗菌、抗炎等多种药理活性<sup>[5]</sup>, LCBP被认为是这些生物活性的主要有效成分<sup>[6-8]</sup>。目前吉林省蓝靛果的种植面积广、产量高, 蓝靛果产业的发展对蓝靛果的综合利用水平与作用机制的深入研究提出了更高的要求。

本研究采用环磷酰胺 (cyclophosphamide, CTX) 诱导构建小鼠免疫抑制病理模型, 基于PacBio Sequel第三代微生物16S rRNA高通量测序平台检测LCBP干预后模型小鼠结肠内微生物菌群结构变化, 结合血液中免疫细胞指标、结肠病理组织学观察与气相色谱-质谱联用 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 测定肠道内SCFAs含量, 探讨LCBP对免疫抑制模型小鼠的免疫功能调节与肠道菌群分布的影响。本研究基于以往对于LCBP的免疫调节功效研究, 加入了肠道菌群调节功效考察指标,

将肠道微环境调节与免疫功能调节相结合进行关联研究, 以期推进蓝靛果深加工产业的科学化发展, 延长蓝靛果产业链, 进而促进吉林省的生态环境高水平保护和区域经济高质量发展。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 动物、材料与试剂

8周龄体质量20 g左右的清洁级雄性ICR小鼠由长春市亿斯实验动物技术有限责任公司提供 (生产许可证号: SCXK (吉)-2020-0002), 饲养和实验过程均严格按照实验动物饲养规程操作。

蓝靛果由吉林良好兴峰农业科技有限公司赠送。

注射用CTX 江苏恒瑞医药股份有限公司; SCFAs标准品 (乙酸、丙酸、正丁酸、异丁酸、正戊酸、异戊酸) 上海麦克林生化科技有限公司; 福林-酚试剂、没食子酸标准品 上海源叶生物技术有限公司。

### 1.2 仪器与设备

N1300旋转蒸发器 上海爱朗仪器有限公司; BM830全自动血细胞分析仪 北京宝灵曼阳光科技有限公司; GC-三重四极杆质谱仪 美国Thermo Fisher公司; FC5515R台式冷冻离心机 奥豪斯国际贸易 (上海) 有限公司; IX73光学显微镜 奥林巴斯 (北京) 销售服务有限公司; FDU-2110冷冻干燥机 东京理化器械株式会社; 1-14小型台式离心机 德国Sigma公司; ME204型电子分析天平 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; IDA-2000数字医学图像分析系统 北京空海科技发展有限公司; UV 1800型紫外-可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 LCBP提取物冻干粉的制备

参考Wu Shusong等<sup>[9]</sup>的方法提取LCBP样品。取冻鲜蓝靛果, 加入体积分数75%乙醇溶液作为提取溶剂,

料液比为1:4, 避光超声提取2次, 每次30 min, 合并提取液, 6 000 r/min离心15 min, 取上清液于45 °C旋转蒸发浓缩, -80 °C真空冷冻干燥72 h, 得到LCBP提取物冻干粉。

### 1.3.2 LCBP提取物冻干粉总多酚含量的测定

参考王海坤等<sup>[10]</sup>的方法, 采用福林-酚比色法测定蓝靛果提取物中总多酚的含量。精密称量没食子酸标准品5 mg, 配制成0.2 mg/mL的标准溶液, 分别精密量取1、2、3、4、5 mL加水定容至10 mL。分别精密量取没食子酸标准溶液200 μL, 加入福林-酚试剂1 mL, 摇匀, 反应5 min后, 加入800 μL 7.5%碳酸钠溶液, 室温避光反应2 h, 于765 nm波长处测定吸光度。精密称取LCBP冻干粉0.1 g, 加水定容至25 mL, 稀释5倍体积, 按照上述方法操作, 于765 nm波长处测定样品溶液的吸光度。以没食子酸标准品绘制标准曲线, 以吸光度为纵坐标, 没食子酸质量浓度为横坐标, 以纯水为空白溶液, 线性回归方程为:  $y=13.934x-0.2521$ ,  $R^2=0.9957$ , 线性范围为0.02~0.10 mg/mL, 线性良好。根据标准曲线方程计算, 蓝靛果提取物冻干粉中总多酚含量为(54.63±0.21) mg/g。

### 1.3.3 动物分组处理

将32只清洁级ICR小鼠适应性饲养7 d后, 随机分为4组, 每组8只, 分别为空白对照组(KC组)、模型组(MC组)、LCBP低剂量组、LCBP高剂量组。参考Liu Yingjuan<sup>[11]</sup>、Qi Zeng<sup>[12]</sup>的方法, 结合本实验前期预实验结果, 空白对照组和MC组每天灌胃生理盐水; LCBP低剂量组每天灌胃LCBP提取物, 给药量为150 mg/(kg  $m_b \cdot d$ ), 相当于LCBP 8.20 mg/(kg  $m_b \cdot d$ ); LCBP高剂量组每天灌胃LCBP提取物, 给药量为500 mg/(kg  $m_b \cdot d$ ), 相当于LCBP 27.32 mg/(kg  $m_b \cdot d$ )。4组小鼠灌胃量均为0.1 mL/10 g  $m_b$ , 连续21 d。除空白对照组外, 其余各组分别于17、19 d和21 d进行腹腔注射CTX(80 mg/(kg  $m_b \cdot d$ )), 构建免疫抑制小鼠模型。末次给药24 h后, 对所有小鼠进行眼球采血并保存。无菌条件下称取小鼠结肠末端的成型粪便0.3 g置于冻存管中, -80 °C超低温储存, 分析待用。

### 1.3.4 指标测定

根据组织病理考察、免疫器官指数与血液免疫指标筛选LCBP起效剂量, 对有效剂量组进行肠道内容物的16S rRNA高通量测序与粪便SCFAs含量测定, 对LCBP对机体免疫功能调节与肠道菌群调节作用进行联合分析。

#### 1.3.4.1 小鼠一般状态观察与记录

观察并记录各组小鼠给药前后及造模后皮毛色泽、进食量、自主活动等一般状态。

#### 1.3.4.2 免疫器官指数测定

实验第21天灌胃给药24 h后, 对小鼠进行摘眼球取血, 采用颈椎脱臼法处死。摘取小鼠脾脏与胸腺, 滤纸吸干水分后称质量, 按下式计算脏器指数(胸腺指数与脾脏指数)。

$$A/(mg/g) = \frac{m}{m_0 \times 10}$$

式中:  $A$ 为脾脏指数/胸腺指数;  $m$ 为脾脏/胸腺质量/mg;  $m_0$ 为小鼠体质量/g。

#### 1.3.4.3 血液免疫指标测定

第21天灌胃给药24 h后, 对小鼠进行摘眼球取血, 血液置于2 mL抗凝离心管中, 根据全自动血细胞分析仪检测要求, 检测抗凝血中的白细胞(white blood cell, WBC)、红细胞(red blood cell, RBC)、淋巴细胞(lymphocyte, LYM)、血小板(platelet, PLT)、中性粒细胞(neutrophil, NEU)水平, 记录数据并分析。

#### 1.3.4.4 结肠组织病理考察

小鼠处死后, 取结肠组织置于4%多聚甲醛溶液中固定保存48 h, 采用乙醇对组织进行常规病理脱水处理, 将组织浸入无水乙醇与二甲苯混合液直至透明后浸蜡、包埋、切片、苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色, 光学显微镜下观察小鼠结肠形态变化。

#### 1.3.4.5 盲肠内容物微生物16S rRNA高通量测序

基于PacBio Sequel平台进行小鼠盲肠内容物中微生物的DNA高通量测序。对样品进行Beta多样性和Alpha物种多样性分析, 计算得出各样品的Ace、Chao1、Shannon及Simpson指数, 根据微生物分类特征对样品进行分类学分析, 绘制门、属分类学水平物种分布柱状图, 寻找具有统计学差异的生物标志物。

#### 1.3.4.6 粪便中SCFAs水平的测定

样品预处理: 用GC-MS法检测粪便中SCFAs含量, 将-80 °C冻存的粪便置于4 °C下解冻, 精密称取100 mg, 加入2 mL超纯水, 涡旋振荡混匀, 4 °C条件下14 000 r/min离心15 min, 取上清液, 加入50%浓硫酸, 调节pH值为1~2, 4 °C孵育30 min, 偶尔摇匀。经无水乙醚萃取后, 相同条件下离心取上清液。上清液经氮气吹干后加入正己烷复溶, 过0.22 μm微孔滤膜, 用于GC-MS分析。

标准品的处理: 精密吸取乙酸、丙酸、正丁酸、异丁酸、正戊酸、异戊酸标准品, 用正己烷配制成不同质量浓度梯度的标准溶液(0.001~0.010 mg/mL), 过0.22 μm微孔滤膜, 用于GC-MS分析。

GC条件: 色谱柱为DB-Heavy WAX(30 m×0.25 mm, 0.25 μm); 升温程序为初始温度70 °C保持1 min, 以15 °C/min升至120 °C, 保持1 min, 以10 °C/min升至200 °C, 保持5 min; 载气为氮气; 进样口

温度为270℃；载气流速为2 mL/min；进样量1.0 μL；进样方式为不分流进样；检测器（氢焰离子化检测器（flame ionization detector, FID））温度280℃。

MS条件：电子轰击离子源；离子源温度250℃；四极杆温度250℃；电子能量70 eV；扫描模式为全扫描；质量扫描范围 $m/z$  30~500。

#### 1.4 数据处理与分析

所有数据以平均值±标准偏差表示，采用SPSS 20.0软件的单因素方差分析（One-way ANOVA）和Tukey检验进行差异显著性分析， $P<0.05$ 代表差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 小鼠一般状态

各组小鼠给药前的状态基本无区别。给药后，空白对照组小鼠表现为毛色正常且有光泽、行动敏捷、腰背平直、眼睛明亮、进食量良好；LCBP高剂量组小鼠出现进食量增加的现象。第17天开始造模后，MC组小鼠出现了轻微的精神萎靡、皮毛疏松、食欲不振、外形消瘦等现象。LCBP高、低剂量组的小鼠较MC组状态均得到不同程度的改善，进食量趋于正常，精神状态良好。

### 2.2 LCBP对小鼠免疫器官指数的影响

脾脏和胸腺是人体主要的免疫器官，其对应脏器指数的变化可以反映机体免疫能力的变化<sup>[13]</sup>。由表1可知，与空白对照组比较，MC组小鼠的脾脏指数和胸腺指数极显著降低（ $P<0.01$ ），说明小鼠的免疫抑制模型造模成功；与MC组相比，LCBP低剂量组小鼠的脾脏指数显著增加（ $P<0.05$ ），LCBP高剂量组小鼠的脾脏指数与胸腺指数均极显著增加（ $P<0.01$ ）且接近空白对照组，说明LCBP对免疫抑制小鼠的免疫器官有一定的保护和促进功能恢复的作用，其中高剂量LCBP作用显著。

表1 LCBP对免疫抑制小鼠免疫器官指数的影响  
Table 1 Effect of LCBP on immune organ indexes of immunosuppressed mice

组别	脾脏指数/(mg/g)	胸腺指数/(mg/g)
KC组	4.528±0.012	3.052±0.008
MC组	2.234±0.006**	1.528±0.004**
LCBP低剂量组	3.217±0.004#	1.622±0.005
LCBP高剂量组	5.017±0.007###	2.698±0.001###

注：与KC组比较，\*，差异显著（ $P<0.05$ ），\*\*，差异极显著（ $P<0.01$ ）；与MC组比较，#，差异显著（ $P<0.05$ ）；###，差异极显著（ $P<0.01$ ）。下同。

### 2.3 LCBP对免疫抑制小鼠血液免疫指标的影响

由表2可知，MC组小鼠WBC、RBC、LYM、PLT、NEU水平均低于空白对照组（ $P<0.05$ 、 $P<0.01$ ），其中WBC、LYM水平极显著下降（ $P<0.01$ ），

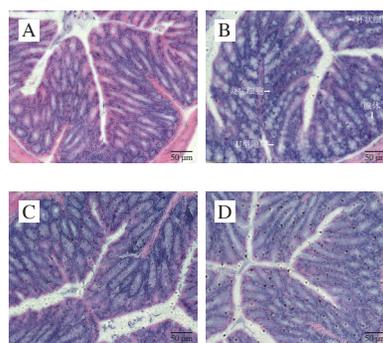
提示免疫抑制模型造模成功。给药21 d后，LCBP低剂量组小鼠的WBC、LYM、PLT水平相较MC组均有所回升（ $P<0.05$ ），RBC、NEU水平较MC组无显著差异；LCBP高剂量组小鼠的WBC、RBC、LYM、PLT、NEU水平较MC组均有所回升（ $P<0.05$ 、 $P<0.01$ ），其中WBC、LYM、PLT极显著回升（ $P<0.01$ ）。由此可知，LCBP能够提升机体免疫功能细胞水平，其中高剂量LCBP作用显著。

表2 LCBP对免疫抑制小鼠血液生化指标的影响  
Table 2 Effect of LCBP on blood biochemical indicators of immunosuppressed mice

组别	WBC水平 ( $\times 10^9$ 个/L)	RBC水平 ( $\times 10^{12}$ 个/L)	LYM水平 ( $\times 10^9$ 个/L)	PLT水平 ( $\times 10^9$ 个/L)	NEU水平 ( $\times 10^9$ 个/L)
KC组	5.97±0.67	9.58±0.99	4.54±1.11	903.20±190.66	1.82±0.41
MC组	1.56±0.29**	8.30±0.54*	1.52±0.69**	436.67±98.83*	0.55±0.38*
LCBP低剂量组	3.45±1.94#	8.42±0.76	2.97±1.15#	563.75±68.98#	0.76±0.67
LCBP高剂量组	9.37±2.24###	9.54±0.82#	5.71±1.04###	1087.00±118.04###	2.35±1.84#

### 2.4 病理学观察结果

由图1可以看出，空白对照组小鼠结肠形态正常，杯状细胞和U型隐窝数量较多，腺体分布整齐，炎症细胞浸润及渗出程度低。MC组小鼠的杯状细胞和U型隐窝明显减少，腺体排列无序且发生变形，可见炎性细胞浸润，黏膜充血水肿。与MC组相比，LCBP低剂量组小鼠杯状细胞和U型隐窝有所增多，腺体排列较整齐，水肿减轻，炎症细胞浸润减少；LCBP高剂量组小鼠已经表现出正常杯状细胞和U型隐窝，腺体排列整齐，炎症细胞浸润明显变少。说明LCBP可减轻CTX引起的小鼠肠道组织损伤，其中高剂量LCBP作用明显。



A. KC组；B. MC组；C. LCBP低剂量组；D. LCBP高剂量组。

图1 小鼠结肠组织HE染色（20×）

Fig. 1 HE stained colonic tissue in mice (20 ×)

### 2.5 16S rRNA测序结果

#### 2.5.1 肠道菌群Beta多样性分析

维恩图能够展示组间的共有及特有特征操作分类单元（operational taxonomic unit, OTU）数目，直观地表现出组间特征的重合与区分情况<sup>[14]</sup>。由图2可知，空白对

照组、MC组、LCBP高剂量组（以下简称LCBP组）3组小鼠共分析得到OTU物种447个，空白对照组肠道菌群中共得到413个OTU，MC组中共得到373个OTU，LCBP组共得到378个OTU，3组共有物种数目311个；空白对照组特有物种数目21个，MC组和LCBP组特有物种数目均为10个。通过OTU数目分布分析得到，免疫抑制模型造成了小鼠肠道菌群数量的减少，而LCBP组小鼠的肠道菌群丰度有一定的回升，由此得出LCBP对免疫抑制小鼠肠道菌群的丰度具有正向调节作用。

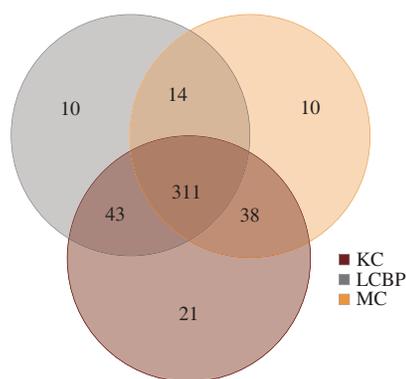
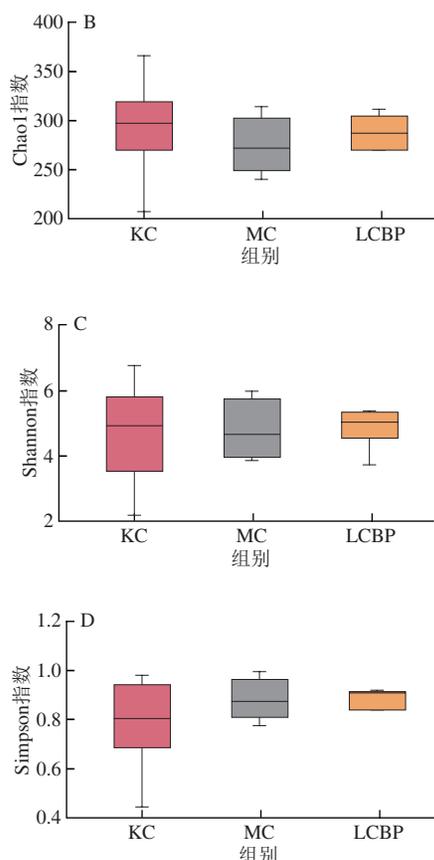
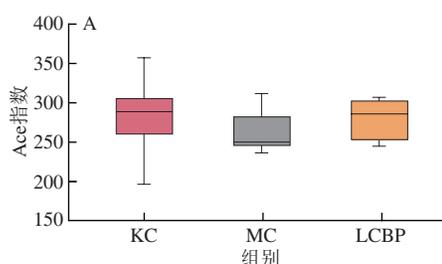


图2 小鼠肠道菌群维恩图  
Fig. 2 Venn diagram of intestinal microflora in mice

### 2.5.2 肠道菌群Alpha多样性分析

Alpha多样性反映单个样品物种丰度及物种多样性，有多种衡量指标：Ace指数和Chao1指数可用于衡量物种丰度；Simpson指数用于评价物种多样性<sup>[15]</sup>。Simpson指数在0~1之间，0表示无限接近多样，1表示没有多样性。

由图3可知，空白对照组小鼠肠道菌群Ace、Chao1指数均高于MC组、LCBP组，但LCBP组小鼠肠道菌群的Ace指数、Chao1指数较MC组均有所回升，说明LCBP对免疫抑制小鼠肠道菌群总体丰度的升高起到了促进作用。MC组小鼠肠道菌群的数量最少，但是Simpson指数与Shannon指数最高，这说明MC组小鼠肠道菌群的均匀度较LCBP组与空白对照组有所升高，可能与有益菌丰度降低、致病菌丰度升高有关。



A~D.分别为Ace指数、Chao1指数、Shannon指数与Simpson指数。

图3 小鼠肠道菌群的Alpha多样性  
Fig. 3 Alpha diversity of intestinal microflora in mice

### 2.5.3 肠道菌群构成分析

#### 2.5.3.1 小鼠粪便样本在门水平的菌群丰度及差异

从细菌门水平分析（图4A），相对丰度最高的10个菌群分别为厚壁菌门（Firmicutes）、拟杆菌门（Bacteroidetes）、疣微菌门（Verrucomicrobia）、ε-变形菌纲（Epsilonbacteraeota）、软壁菌门（Tenericutes）、变形菌门（Proteobacteria）、脱铁杆菌门（Deferribacteria）、狄氏副拟杆菌（Patescibacteria）、放线菌门（Actinobacteria）、蓝细菌门（Cyanobacteria），其中，厚壁菌门和拟杆菌门为肠道的优势菌群，相对丰度占比约80%以上。拟杆菌门可通过Toll样受体4（Toll-like receptor 4, TLR4）诱导次级免疫应答反应进而调节白细胞介素-6（interleukin 6, IL-6）炎症因子的释放。厚壁菌门包括众多有益菌，其中乳酸杆菌是一种常见于酸奶和其他发酵乳制品中的益生菌。厚壁菌门微生物代谢产生乙酸盐、乳酸盐等短链脂肪酸盐，可调整肠道内共生菌群比例，减轻肠道炎症反应，调节免疫平衡<sup>[15-16]</sup>。本研究中，与空白对照组比较，MC组小鼠的厚壁菌门、ε-变形菌纲、变形菌门、狄氏副拟杆菌、放线菌门和蓝细菌门的相对丰度降低。其中MC组小鼠粪便中厚壁菌门的相对丰度

较空白对照组降低了46.2%，而其在LCBP组中的平均丰度较MC组提高了28.23%；拟杆菌门在MC组小鼠粪便中相对丰度较空白对照组提升了98.63%，而经过LCBP干预后其相对丰度较MC组降低了16.90%。通过对各组样品中厚壁菌门与拟杆菌门相对丰度的对比分析发现，免疫抑制小鼠肠道中的F/B值（F为厚壁菌门的丰度值；B为拟杆菌门的丰度值）由空白对照组的3.40降低到了0.92，LCBP干预后F/B值提高到1.41。结果表明，LCBP可能通过提升厚壁菌门的相对丰度，同时降低拟杆菌门的相对丰度，以达到调节肠道菌群结构的正向作用；其通过提升F/B值增加有益菌比例，从而增加有益菌代谢产物丰度，降低肠道内炎症反应，促进免疫功能的正向调节。这与2.5.2节中菌群结构分析的结论相一致。

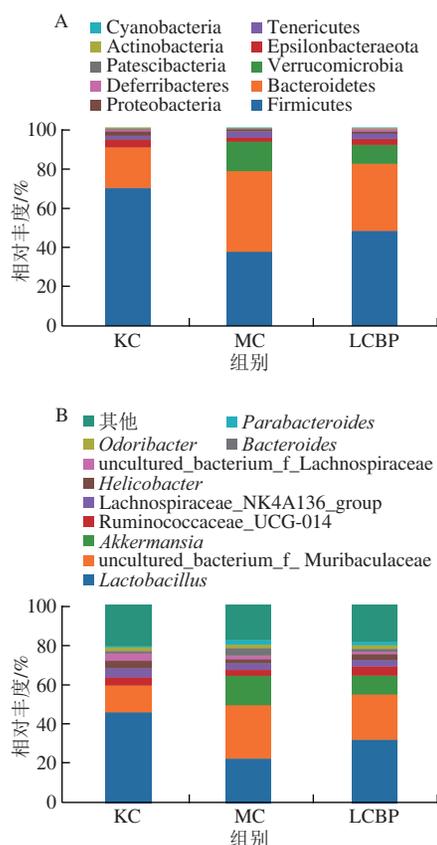


图4 门水平(A)及属水平(B)的小鼠肠道菌群相对丰度

Fig. 4 Relative abundance of intestinal microflora in mice at phylum (A) and genus (B) levels

#### 2.5.3.2 小鼠粪便样本在属水平上的菌群丰度及差异

从图4B细菌属水平上分析，相对丰度排名前10位的菌属有乳杆菌属（*Lactobacillus*）、未培养的Muribaculaceae、艾克曼菌属（*Akkermansia*）、疣微菌科UGG-014（*Ruminococcaceae* UGG-014）、毛螺旋菌科（*Lachnospiraceae*）、螺杆菌属（*Helicobacter*）、未培养的毛螺旋菌科（*Lachnospiraceae*）、拟杆菌属

（*Bacteroides*）、臭杆菌属（*Odoribacter*）、副拟杆菌属（*Parabacteroides*）。疣微菌科UGG-014可调节脂类代谢，并调节肥胖相关及胃肠道稳态相关的有益共生菌数量<sup>[17]</sup>。拟杆菌属为革兰氏染色阴性的杆菌，在机体免疫紊乱或免疫抑制的生理状态下，会导致内源性感染<sup>[18]</sup>。乳杆菌属是有益于宿主健康的微生物，能发酵糖类产生乳酸，维护人体健康和调节免疫功能<sup>[19]</sup>。从图4B可知，与空白对照组相比，MC组小鼠粪便中的有益共生菌（包括乳杆菌属、疣微菌科UGG-014、螺杆菌属）的丰度均明显下降，其中乳杆菌属的丰度降低幅度最大，为50.72%；艾克曼菌属、拟杆菌属、狄氏副拟杆菌属的丰度较空白对照组明显增加，其中艾克曼菌属的相对丰度由空白对照组的0.04%升高至14.81%。而LCBP组小鼠粪便中上述菌属的相对丰度则趋于向接近空白对照组水平变化。与MC组相比，LCBP组小鼠粪便中的乳杆菌属相对丰度升高，说明LCBP通过调节益生菌及致病菌的分布进而影响胃肠道内稳态。

#### 2.5.4 组间差异显著性分析结果

三元相图可以直观地显示出不同物种在各组中的比重和关系。三角形的3个边分别代表3个组，可以度量相应组别的物种丰度。本研究通过Python软件作图脚本制作三元相图展示空白对照组、MC组、LCBP组小鼠粪便中不同肠道菌群的比重与关系。从图5中可以看出，在门水平上，3组小鼠粪便中丰度最高的5个物种为： $\epsilon$ -变形菌纲（*Epsilonbacteraeota*），其在空白对照组、MC组、LCBP组中占比分别为0.428、0.237、0.334；疣微菌门（*Verrucomicrobia*），其在空白对照组、MC组、LCBP组小鼠粪便中占比分别为0.002、0.608、0.390；拟杆菌门（*Bacteroidetes*），其在空白对照组、MC组、LCBP组小鼠粪便中占比分别为0.216、0.428、0.356；软壁菌门（*Tenericutes*），其在空白对照组、MC组、LCBP组小鼠粪便中占比分别为0.243、0.404、0.353；厚壁菌门（*Firmicutes*），其在空白对照组、MC组、LCBP组小鼠粪便中的占比分别为0.449、0.242、0.310。其中疣微菌门只在MC组和LCBP组小鼠粪便中出现，艾克曼菌属归属于疣微菌门，其有助于维持消化道健康，其生理活性包括降低糖尿病、炎症及肥胖等疾病的患病概率，用CTX造模后可能使疣微菌门菌群失调，进而激发了机体的免疫反应<sup>[20-21]</sup>。

三元相图分析结果显示，空白对照组、MC组、LCBP组小鼠粪便中的肠道菌群分布均发生了改变，与空白对照组比较，MC组小鼠粪便中的 $\epsilon$ -变形菌纲、厚壁菌门相对丰度明显降低，而疣微菌门、拟杆菌门和软壁菌门的相对丰度升高。相比于MC组，LCBP组小鼠粪便中这5种细菌相对丰度均趋向于接近空白对照组水平变化。上述细菌群落组成与图4中的结果一致。

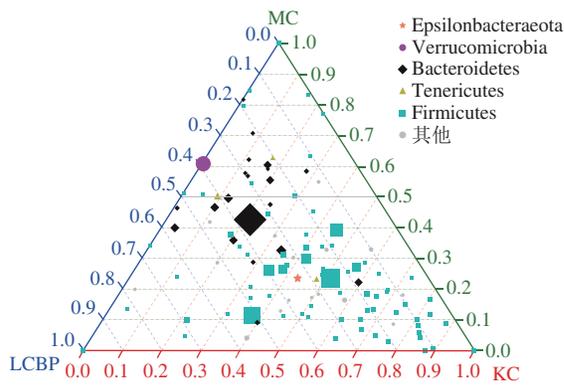


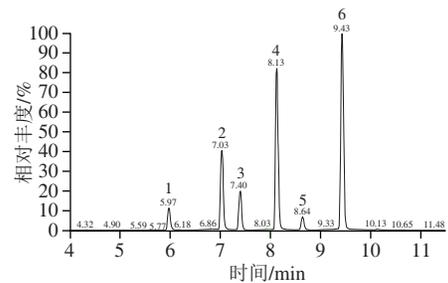
图5 小鼠肠道菌群的三元相图分析

Fig. 5 Ternary phase diagram analysis of intestinal microflora in mice

2.6 小鼠粪便SCFAs质量浓度的测定结果

SCFAs是指碳原子数量小于6的羧酸，是肠道微生物的一类重要代谢产物，SCFAs可以作为结肠、回肠细胞的能量来源，也可以调控肠上皮细胞的屏障与防御功能，其中肠道中含量最高的3种SCFAs分别为乙酸、丙酸和丁酸<sup>[22]</sup>，其是细菌发酵多糖过程的最终产物，构成了肠道环境的基本部分，有助于肠功能的调节，也可以保护结肠的生理状态，它们（特别是丁酸）还对上皮生长有刺激作用，被刺激的细胞为肠黏膜提供能量来源；SCFAs通过降低肠道pH值来阻止肠道中致病菌的复制，因此也抑制了感染性疾病的发展<sup>[23]</sup>。SCFAs具有调节先天免疫的功能，可以影响免疫细胞（巨噬细胞、NEU和树突状细胞）向外周募集<sup>[24]</sup>。SCFAs混合标准品的GC-MS总离子流图及分析结果分别如图6、表3所示。由图7可知，免疫抑制小鼠的SCFAs总量由空白对照组的1.66 mg/mL降低至0.83 mg/mL ( $P < 0.01$ )，LCBP干预后，小鼠粪便中的SCFAs总量回升至1.83 mg/mL ( $P < 0.01$ )，表明免疫抑制模型小鼠粪便结肠内SCFAs含量明显降低，LCBP可能通过干预SCFAs含量变化从而调节体内免疫功能。肠道微生物菌群能够刺激免疫系统的正常发育，并在免疫细胞的成熟过程中发挥着重要作用，乙酸是一种双歧杆菌高产的SCFAs，通过刺激G蛋白偶联受体43抗体（G protein-coupled receptor 43, GPR43）调节肠道炎症，帮助维持肠道上皮屏障功能<sup>[25-27]</sup>。SCFAs可调节T细胞和B细胞的分化及其介导的抗原特异性适应性免疫<sup>[28]</sup>。此外，SCFAs是脂类合成的原料，具有调节能量稳态和能量代谢的潜在作用<sup>[29]</sup>。研究表明，丁酸可抑制组蛋白去乙酰化，进而影响树突状细胞的成熟<sup>[30-31]</sup>；同时，丁酸还可以抑制巨噬细胞和树突状细胞的募集，最终调节WBC转运，抑制单核细胞的树突状细胞中趋化因子的表达<sup>[32-35]</sup>。在NEU中，SCFAs（丁酸）的存在降低了细胞模型中趋化受体

（C5A过敏毒素趋化因子受体（C5a anaphylatoxin chemotactic receptor, C5AR））和磷酸化细胞表面趋化因子受体2抗体（chemokine(C-X-C motif) receptor 2, CXCR2）的表达，并通过G蛋白偶联受体GPR43抑制NEU在体内的趋化<sup>[36]</sup>。如图7所示，CTX导致免疫抑制后小鼠结肠内的6种SCFAs质量浓度均有一定程度的下降，其中乙酸、丙酸、异丁酸、异戊酸4种SCFAs的质量浓度较空白对照组极显著降低 ( $P < 0.01$ )，LCBP干预后，6种SCFAs的质量浓度较MC组均提高，其中，丙酸、异丁酸、正丁酸3种SCFAs的质量浓度极显著增加 ( $P < 0.01$ )。结果表明，LCBP可调节肠道菌群分泌SCFAs水平，从而调节肠道的上皮屏障功能以及免疫细胞的募集程度，进而调节机体的免疫状态。



1~6.分别为乙酸、丙酸、异丁酸、正丁酸、异戊酸、正戊酸。

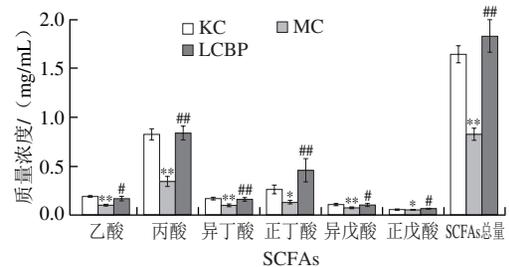
图6 6种SCFAs混合标准品的GC-MS总离子流图

Fig. 6 Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) total ion current (TIC) chromatogram of mixed standard solution of six SCFAs

表3 6种SCFAs的GC-MS分析

Table 3 GC-MS analysis of six SCFAs

序号	保留时间/min	相对分子质量	化合物	回归方程	决定系数 $R^2$
1	5.97	60.05	乙酸	$y = 3 \times 10^6 x - 140 667$	0.999 8
2	7.03	74.08	丙酸	$y = 7 \times 10^6 x + 5 \times 10^7$	0.999 5
3	7.40	88.11	异丁酸	$y = 3 \times 10^6 x + 53 373$	0.999 9
4	8.13	88.11	正丁酸	$y = 4 \times 10^6 x - 127 995$	0.999 6
5	8.64	102.13	异戊酸	$y = 5 \times 10^6 x - 265 760$	0.999 8
6	9.43	102.13	正戊酸	$y = 1 \times 10^7 x - 460 861$	0.999 9



与KC组比较，\*，差异显著 ( $P < 0.05$ )；\*\*，差异极显著 ( $P < 0.01$ )；与MC组比较，#，差异显著 ( $P < 0.05$ )；##，差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

图7 各组小鼠结肠中SCFAs质量浓度变化

Fig. 7 Colonic levels of SCFAs in mice from three groups

## 3 讨论

机体的整体状态影响着其免疫功能,免疫功能的强弱与机体内环境稳定及平衡与否有着必然的内在联系,而免疫功能又受到肠道微生态的直接影响。肠道有大量的淋巴组织,肠道内壁是机体最大的免疫器官,肠道菌群主要通过影响黏膜免疫进而影响免疫性疾病的发生发展<sup>[37]</sup>。多酚可以促进细胞免疫反应,除了抗菌、抗病毒功能外,其还在调节免疫系统中发挥关键作用,可以将自然免疫应答与适应性免疫应答联系起来,促进自然免疫细胞对病原体的识别,诱导特异性免疫应答的产生<sup>[38]</sup>。本研究以LCBP作为研究对象,采用CTX诱导构建免疫抑制小鼠模型,基于PacBio Sequel第三代微生物16S rRNA高通量测序平台考察LCBP对小鼠结肠内微生物菌群结构分布的影响,结合血液中免疫细胞指标、结肠病理组织学观察与肠道内SCFAs质量浓度的测定探究LCBP对免疫抑制模型小鼠免疫功能调节与肠道菌群分布的影响。结果表明,LCBP能够显著提高免疫抑制小鼠的免疫器官(胸腺、脾脏)指数以及血液中免疫细胞的水平;改善免疫抑制病理状态下结肠组织的炎性等损伤状态,增加免疫抑制小鼠肠道菌群的多样性,改善有益有害菌群分布比例,促进厚壁菌门、 $\epsilon$ -变形菌纲、变形菌门、狄氏副拟杆菌、放线菌门和蓝细菌门的生长,抑制拟杆菌门的增殖;显著提高免疫抑制小鼠体内的SCFAs总量,并使乙酸、丙酸、正丁酸、异丁酸、正戊酸、异戊酸6种SCFAs的质量浓度显著提高。因此,LCBP可能通过调节肠道的上皮屏障功能以及免疫细胞的募集程度,进而调节机体的免疫状态。本研究为植物多酚对人体肠道内环境的调节提供了理论依据,同时为机体免疫调节与肠道环境的关联性研究提供了新的思路与证据,为蓝靛果应用于食品、保健食品、特殊医学用途食品等领域提供了科学依据,为益生元产业中多酚的应用提供了新的方向。本研究通过GC-MS检测技术对肠道微生物的代谢产物SCFAs进行检测,并探索了其与其宿主免疫功能的关联性,确认二者存在关联,但对其他肠道微生物类代谢产物的功能仍需进一步探究。

## 参考文献:

- [1] ZHANG X, CHEN B D, ZHAO L D, et al. The gut microbiota: emerging evidence in autoimmune diseases[J]. Trends in Molecular Medicine, 2020, 26(9): 1-12. DOI:10.1016/j.molmed.2020.04.001.
- [2] 杨晓炼,李涵,朱书. 肠道菌群调控宿主天然免疫的机制研究[J]. 中国动物传染病学报, 2021, 29(4): 16-30. DOI:12310.19958/j.cnki.cn31-2031/s.2021.04.002.
- [3] 殷琳,夏文睿,黄国鑫,等. 中药-肠道菌群互作与宿主自身代谢免疫稳态相关性的研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(8): 2526-2538. DOI:10.7501/issn.0253-2670.2022.08.030.
- [4] 张龄予,侯苏芯,张文尉,等. 蓝靛果的化学成分及其提取分离研究进展[J]. 应用化学, 2022, 39(11): 1629. DOI:10.19894/j.issn.1000-0518.220030.
- [5] 周丽萍,王化,李梦莎,等. 蓝靛果保健功能研究进展[J]. 国土与自然资源研究, 2016, 5: 92-95. DOI:10.16202/j.cnki.tnrs.2016.05.026.
- [6] LIU Suwen, SUI Qianqian, ZHAO Yanxue, et al. *Lonicera caerulea* berry polyphenols activate SIRT1, enhancing inhibition of RAW264.7 macrophage foam cell formation and promoting cholesterol efflux[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(25): 7157-7166. DOI:10.1021/acs.jafc.9b02045.
- [7] LIU Suwen, YOU Lu, ZHAO Yuhua, et al. Wild *Lonicera caerulea* berry polyphenol extract reduces cholesterol accumulation and enhances antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*[J]. Food Research International, 2018, 107: 73-83. DOI:10.1016/j.foodres.2018.02.016.
- [8] WANG Yuehua, ZHU Jinyan, MENG Xianjun, et al. Comparison of polyphenol, anthocyanin and antioxidant capacity in four varieties of *Lonicera caerulea* berry extracts[J]. Food Chemistry, 2016, 197: 522-529. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.11.006.
- [9] WU Shusong, HU Ruizhi, NAKANO H, et al. Modulation of gut microbiota by *Lonicera caerulea* L. berry polyphenols in a mouse model of fatty liver induced by high fat diet[J]. Molecules, 2018, 23(12): 3213. DOI:10.3390/molecules23123213.
- [10] 王海坤,张存芳,陈程. Folin-Ciocalteu比色法测定牡丹籽饼、牡丹叶、牡丹籽种壳中总多酚的含量[J]. 应用化工, 2018, 47(8): 1794-1796; 1802. DOI:10.16581/j.cnki.issn1671-3206.2018.08.035.
- [11] LIU Yingjuan, WU Xiaolin, WANG Yue, et al. The immunoenhancement effects of starfish *Asterias rollestoni* polysaccharides in macrophages and cyclophosphamide-induced immunosuppression mouse models[J]. Food & Function, 2020, 11(12): 10700-10708. DOI:10.1039/d0fo01488e.
- [12] QI Zeng, CHEN Lixue, LI Zhuo, et al. Immunomodulatory effects of (24R)-pseudoGinsenoside HQ and (24S)-pseudo-ginsenoside HQ on cyclophosphamide-induced immunosuppression and their anti-tumor effects study[J]. International Journal Molecular Sciences, 2019, 20(4): 836. DOI:10.3390/ijms20040836.
- [13] 丁延祯. 免疫功能与胸腺[J]. 生物学通报, 1984(3): 34-35.
- [14] HUANG A C, JIANG T, LIU Y X, et al. A specialized metabolic network selectively modulates *Arabidopsis* root microbiota[J]. Science, 2019, 364: eaau6389. DOI:10.1126/science.aau6389.
- [15] GRICE E A, KONG H H, CONLAN S, et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome[J]. Science, 2009, 324: 1190-1192. DOI:10.1126/science.1171700.
- [16] 舒中玉,李文静,梁运祥,等. 罗伊乳杆菌对小鼠血清细胞因子含量和肠道菌群的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2018, 30(9): 1008-1012. DOI:10.13381/j.cnki.cjm.201809004.
- [17] SALVA S, MARRANZINO G, VILLENA J, et al. Probiotic *Lactobacillus* strains protect against myelosuppression and immunosuppression in cyclophosphamide-treated mice[J]. International Immunopharmacology, 2014, 22(1): 209-221. DOI:10.1016/j.intimp.2014.06.017.
- [18] WANG B, YU H, HE Y, et al. Effect of soybean insoluble dietary fiber on prevention of obesity in high-fat diet fed mice via regulation of the gut microbiota[J]. Food & Function, 2021, 12(17): 7923-7937. DOI:10.1039/d1fo00078k.
- [19] KEMPERMAN R A, GROSS G, MONDDOT S, et al. Impact of polyphenols from black tea and red wine/grape juice on a gut model microbiome[J]. Food Research International, 2013, 53(2): 659-669. DOI:10.1016/j.foodres.2013.01.034.

- [20] LAVEFVE L, HOWARD L R, CARBONERO F. Berry polyphenols metabolism and impact on human gut microbiota and health[J]. *Food & Function*, 2020, 11(1): 45-65. DOI:10.1039/c9fo01634a.
- [21] CHEN J, ZHANG C, XIA Q, et al. Treatment with subcritical water-hydrolyzed citrus pectin ameliorated cyclophosphamide-induced immunosuppression and modulated gut microbiota composition in ICR mice[J]. *Molecules*, 2020, 25(6): 1302. DOI:10.3390/molecules25061302.
- [22] EL-SHEIKH A A, MORSY M A, OKASHA A M. Inhibition of NF- $\kappa$ B/TNF- $\alpha$  pathway may be involved in the protective effect of resveratrol against cyclophosphamide-induced multi-organ toxicity[J]. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 2017, 39(4): 180-187. DOI:10.1080/08923973.2017.1318913.
- [23] 赵美琪, 王婧, 崔乃玲, 等. 短链脂肪酸与肠道疾病关系的研究进展[J]. *中国现代医药杂志*, 2020, 22(9): 105-108. DOI:10.3969/j.issn.1672-9463.2020.09.029.
- [24] 李翠茹, 彭买姣, 谭周进. 肠道菌群相关短链脂肪酸的研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2022, 30(13): 562-570.
- [25] REHMAN M U, TAHIR M, ALI F, et al. Cyclophosphamide-induced nephrotoxicity, genotoxicity, and damage in kidney genomic DNA of Swiss albino mice: the protective effect of ellagic acid[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2012, 365(1/2): 119-127. DOI:10.1007/s11010-012-1250-x.
- [26] 石春卫, 陈毅秋, 胡静涛, 等. 肠道微生物群对宿主免疫系统发育和功能的调节[J]. *中国免疫学杂志*, 2016, 32(10): 1536-1540. DOI:10.3969/j.issn.1000-484X.2016.10.028.
- [27] 平易, 魏艳玲, 陈东风, 等. 肠道短链脂肪酸与肠黏膜屏障[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2022, 31(5): 508-512.
- [28] 张晨, 敖日格乐, 王纯洁, 等. 短链脂肪酸介导的肠上皮和抗炎调节研究进展[J]. *中国畜牧杂志*, 2021, 57(1): 32-37. DOI:10.19556/j.0258-7033.20200311-03.
- [29] PARADA VENEGAS D, DE LA FUENTE M K, LANDSKRON G, et al. Short chain fatty acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 277. DOI:10.3389/fimmu.2019.00277.
- [30] YAO Y, CAI X, FEI W, et al. The role of short-chain fatty acids in immunity, inflammation and metabolism[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 62(1): 1-12. DOI:10.1080/10408398.2020.1854675.
- [31] DELL'AGLI M, GALLI G V, DAL CERO E, et al. Potent inhibition of human phosphodiesterase-5 by icariin derivatives[J]. *Journal of Natural Products*, 2008, 71(9): 1513-1517. DOI:10.1021/np800049y.
- [32] LAYER K, LIN G, NENCIONI A, et al. Autoimmunity as the consequence of a spontaneous mutation in Rasgrp1[J]. *Immunity*, 2003, 19(2): 243-255. DOI:10.1016/s1074-7613(03)00209-7.
- [33] BLAIS M, SEIDMAN E G, ASSELIN C. Dual effect of butyrate on IL-1 $\beta$ -mediated intestinal epithelial cell inflammatory response[J]. *DNA and Cell Biology*, 2007, 26(3): 133-147. DOI:10.1089/dna.2006.0532.
- [34] KOLACZKOWSKA E, KUBES P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2013, 13(3): 159-75. DOI:10.1038/nri3399.
- [35] NASTASI B. Renewable hydrogen potential for low-carbon retrofit of the building stocks[J]. *Energy Procedia*, 2015, 82: 944-949. DOI:10.1016/j.egypro.2015.11.847.
- [36] MASLOWSKI K M, VIEIRA A T, NG A, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43[J]. *Nature*, 2009, 461: 1282-1286. DOI:10.1038/nature08530.
- [37] 王爱丽, 武庆斌, 孙庆林. 肠道菌群与肠道黏膜免疫系统的相互作用机制[J]. *中国微生态学杂志*, 2009, 21(4): 382-385.
- [38] RAYMOND C R, WILKIE B N. Th-1/Th-2 type cytokine profiles of pig T-cells cultured with antigen-treated monocyte-derived dendritic cells[J]. *Vaccine*, 2004, 22(8): 1016-1023. DOI:10.1016/j.vaccine.2003.08.026.