

螺旋藻对腹泻模型小鼠肠道菌群的影响

李 景¹ 王素英* 师德强

(天津商业大学生物技术与食品科学学院 天津市食品生物技术重点实验室 天津 300134)

摘 要: 为评价螺旋藻对肠道菌群的影响, 采用注射氨苄青霉素的方法, 制造小鼠腹泻模型, 造模成功后灌服不同剂量螺旋藻进行治疗, 取不同治疗时间的粪便样品, 检测双歧杆菌、乳杆菌、大肠杆菌、肠球菌、拟杆菌、产气荚膜梭菌菌群的数量, 并在螺旋藻灌胃 8 d 后, 测定小鼠不同肠段各指标菌群的数量。结果表明, 中高剂量组螺旋藻对腹泻模型小鼠肠道菌群有明显调整作用, 有效缩短了肠道菌群由失调到平衡的时间; 粪便样品同各肠段内容物所反映的菌群的变化趋势相同, 即治疗恢复组的双歧杆菌、乳杆菌数量总体上高于生理盐水组, 肠杆菌、肠球菌、拟杆菌、产气荚膜梭菌数量均低于生理盐水组, 但取样位置不同, 各指标菌群的数量明显存在差异。
关键词: SPF BALB/C 小鼠, 螺旋藻, 腹泻模型, 肠道菌群

The Effects of *Spirulina* on Intestinal Microflora of Diarrhea Model Mice

LI Jing WANG Su-Ying* SHI De-Qiang

(Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology, College of Biotechnology and Food Science,
Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China)

Abstract: The effects of *Spirulina* on intestinal microflora of diarrhea model mice were observed. Diarrhea model mice were geted by gastric perfusion ampicillin, then these mice were given different doses *spirulina* by gavage. Selective culture media were used to culture *bifidobacteria*, *bacterium lacticum*, *enteric bacilli*, *enterococci*, *bacteroid*, *clostridium perfringens* in feces at different times. In order to find the difference of collecting samples from feces and intestine, the quantity of detection flora in different segment of intestine were compared too. The result showed that in middle dose group and high dose group *spirulina* can regulate and improve intestinal flora of diarrhea model mice, and effectively shorten time from disturbance to balance. Fecal sample and intestinal contents sample both manifest a same trend, that is the quantity of *bifidobacteria*, *bacterium lacticum* in treatment recovery group is significantly higher than saline group, and *enteric bacilli*, *enterococci*, *bacteroid*, *clostridium perfringens* is significantly lower than saline group, but each index flora in intestinal contents sample has a significant difference in quantity.

Keywords: SPF BALB/C, Mouse, *Spirulina*, Diarrhea model, Intestinal microflora

螺旋藻作为一种营养保健食品, 不仅含有丰富的蛋白质及多种维生素、矿物质、 β -胡萝卜素、叶

绿素、 γ -亚麻酸等不饱和脂肪酸, 同时含有多种对人体健康有益的活性物质, 具有调节人体生理平

基金项目: 天津滨海地区适生螺旋藻种选育、中试研究、及其生理活性物质研发(No. 06YFGZNC04200)

* 通讯作者: Tel: 86-22-81720629; E-mail: Wsyang@tjcu.edu.cn

收稿日期: 2008-07-06; 接受日期: 2008-10-22

衡、抗疲劳、增强机体免疫力等多种保健功效。Tsuchihashi 等报道了在食物中添加 5% 的螺旋藻, 小鼠盲肠内乳杆菌的数量比对照组小鼠增加了 3 倍^[1]。马淑霞等利用抗生素脱污染模型研究螺旋藻对小鼠肠道菌群的影响, 与自然恢复组相比, 肠道中肠球菌、肠杆菌、类杆菌、双歧杆菌有显著增加($P < 0.01$), 从微生态的角度初步观察了螺旋藻对菌群失调的调整作用^[2]。

为更全面的了解螺旋藻对肠道菌群的影响, 并比较不同采样位点所反映结果的差异, 本文用 22.4 g/(kg · d) 的氨苄青霉素连续灌胃 5 d, 造成小鼠腹泻模型^[3-5], 之后用不同剂量的螺旋藻灌胃, 分别在灌胃螺旋藻 2 d、4 d、6 d、8 d 后采取粪便样品, 并在 8 d 后处死各组小鼠, 取空回肠、盲肠、结肠内容物样品。所有样品均以双歧杆菌、乳杆菌、肠杆菌、肠球菌、拟杆菌、产气荚膜梭菌为检测指标^[6], 研究螺旋藻对腹泻模型小鼠肠道菌群的影响。

1 材料

1.1 实验动物

SPF BALB/C 小鼠 70 只, 三周龄, 雌雄各半, 18 g~22 g。

1.2 药物

市售鄂尔多斯螺旋藻粉, 注射用氨苄青霉素(山东鲁抗医药)。

1.3 培养基

EMB 培养基、BDS 培养基、TPY 琼脂培养基、TSC 培养基、LBS 琼脂和肠球菌琼脂均购自青岛海博生物技术有限公司。

2 方法

2.1 动物分组

70 只小鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为 7 组, 每组 10 只。正常一组、正常二组、腹泻模型组、生理盐水组、螺旋藻高剂量组、螺旋藻中剂量组、螺旋藻低剂量组。

2.2 模型建立

对腹泻模型组、生理盐水组、螺旋藻高剂量组、螺旋藻中剂量组和螺旋藻低剂量组小鼠, 每次灌胃 0.45 g/mL 浓度的氨苄青霉素 0.5 mL, 每天 2 次, 连续 5 d, 所有小鼠均出现水样稀便; 正常一组和二

组灌胃 0.5 mL 生理盐水, 每天 2 次。

2.3 螺旋藻剂量

螺旋藻以成人推荐量为参考, 倍比配置, 低剂量组: 0.2% 螺旋藻, 中剂量组: 2%, 高剂量组: 15%; 各剂量组小鼠每只每日灌胃 2 次, 每次 1 mL。

2.4 小鼠肠道菌群分析

2.4.1 粪便活菌计数: 腹泻模型组在造腹泻模型前和造模成功后 2 h, 无菌采取粪便样品进行活菌计数, 并与正常一组对比分析。正常二组、生理盐水组和各螺旋藻剂量组分别于灌胃螺旋藻 2 d、4 d、6 d、8 d 后, 无菌采取粪便样品, 将所有样品连续 10 倍稀释, 每个稀释度取样 0.1 mL 涂布于 EMB、BDS、TPY、TSC、LBS、肠球菌琼脂平板, 37°C, 厌氧培养 48 h 后分别对肠杆菌、拟杆菌、双歧杆菌、产气荚膜梭菌和乳酸杆菌进行计数。

2.4.2 各段肠道内容物活菌计数: 腹泻模型组小鼠造模成功后与正常一组一起处死, 其他各组于灌胃螺旋藻 8 d 后处死, 处死后立即在无菌条件下, 取空回肠、盲肠和结肠内容物进行肠道菌群活菌计数, 方法同粪便活菌计数。

2.5 统计学处理

实验数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析, 不同实验组之间的差异分析采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有极显著性统计学意义。

3 结果与分析

3.1 腹泻模型验证

氨苄青霉素造模 5 d 后, 所有小鼠均出现腹泻临床症状, 立即采取粪便样品进行细菌计数及统计学分析, 结果见表 1。同时解剖正常组和腹泻模型组小鼠, 观察腹泻模型造型前后盲肠变化, 结果见图 1 和图 2。

由表 1 可知, 肠道双歧杆菌、乳杆菌、肠杆菌、拟杆菌、产气荚膜梭菌群数量明显改变, 其中产气荚膜梭菌数量明显增加, 其他各组菌群数量都有不同程度的减少, 模型组与正常组小鼠肠道菌群之间存在着显著性差异($P < 0.01$, 表 1), 解剖正常组小鼠和腹泻组小鼠, 发现腹泻组小鼠盲肠肿胀充血, 肠壁变薄, 内容物呈水状(见图 2), 上述结果证实通过注射氨苄青霉素, 成功建立菌群失调模型。

表 1 模型组小鼠肠道菌群均值($\bar{x}\pm s$) (lg10⁶/g)
Table 1 The mean values of intestinal microflora of diarrhea model mice

组别 Group	双歧杆菌 <i>Bifidobacteri a</i>	乳杆菌 <i>Bacterium lactic m</i>	肠杆菌 <i>Enteric bac lli</i>	肠球菌 <i>Enterococ i</i>	拟杆菌 <i>Bacteroi</i>	产气荚膜梭菌 <i>Clostridium perfringen</i>
正常组 Normal group	7.14±0.14	7.25±0.17	6.92±0.1	4.95±0.1	6.29±0.2	5.76±0.15
腹泻模型组 Diarrhea model group	5.72±0.15*	4.90±0.16**	5.79±0.33 *	4.62±0.25*	4.96±0.14 *	6.92±0.13*

注: 与正常组相比, **: 表示 $P<0.01$; *: $P<0.05$.
Note: Compared to normal group, **: $P<0.01$; *: $P<0.05$.



图 1 正常小鼠盲肠
Fig. 1 the caecum of normal mouse



图 2 腹泻模型小鼠盲肠
Fig. 2 the caecum of diarrhea model mouse

3.2 灌胃螺旋藻后腹泻模型小鼠肠道菌群的动态变化

腹泻模型成功建立后, 灌胃不同剂量螺旋藻, 分别于 2 d、4 d、6 d、8 d, 采取粪便进行细菌计数及统计学分析, 结果见图 3~图 8。

生理盐水组小鼠在灌胃螺旋藻 2 d 后, 粪便中的双歧杆菌、乳杆菌数量较腹泻模型组有所回升, 但仍明显低于正常组(见图 3、4); 肠杆菌、肠球菌、拟杆菌数量异常增殖, 远远高于正常组(见图 5、6、

7); 产气荚膜梭菌略有下降(见图 8); 在随后的 4 d、6 d、8 d 后, 双歧杆菌和乳杆菌都有不同程度的增殖(见图 3、4), 肠杆菌、肠球菌、拟杆菌、产气荚膜梭菌数量逐渐降低(见图 5~图 8)。但都仍与正常组水平存在明显差异($P<0.01$), 这说明氨苄青霉素造成的菌群失调症状, 在没有药物治疗的情况下有自我恢复的趋势, 此结论与梁冰等人的研究结果相一致^[4]。

螺旋藻低剂量组小鼠 2 d 后, 双歧杆菌、乳杆菌数量显著高于生理盐水组($P<0.01$)(见图 3、4), 肠杆菌与生理盐水组无显著差异(见图 5), 肠球菌、拟杆菌、产气荚膜梭菌数量显著低于生理盐水组($P<0.01$)(见图 6~图 8); 4 d、6 d 后肠杆菌数量也显著低于生理盐水组(见图 5); 8 d 后双歧杆菌、乳杆菌数量显著高于生理盐水组($P<0.01$)(见图 3、4), 但仍低于正常组, 肠杆菌、拟杆菌与生理盐水组无显著差异(见图 5、7), 产气荚膜梭菌数量显著低于生理盐水组($P<0.01$)(见图 8), 但各指标菌群数量与正常组还存在较大差异, 这说明低剂量螺旋藻对小鼠肠道菌群有一定的调整作用。螺旋藻中剂量组在 2 d、4 d、6 d、8 d 后, 双歧杆菌和乳杆菌都有很大程度的增殖, 明显高于生理盐水组($P<0.01$)(见图 3、4), 肠杆菌、肠球菌、拟杆菌、产气荚膜梭菌数量则明显低于生理盐水组($P<0.01$)(见图 5~图 8), 并逐渐接近正常组小鼠菌群数量。这说明中剂量的螺旋藻可明显增殖双歧杆菌、乳杆菌, 抑制肠道菌群的异常增殖, 调整肠道菌群失调, 维持肠道平衡, 中剂量组对各菌群的调整作用程度好于低剂量组。螺旋藻高剂量组在 2 d、4 d、6 d、8 d 后, 各指标菌群变化趋势与中剂量相同, 数量上也基本一致。这说的螺旋藻对小鼠腹泻具有调整作用, 但调整作用的强弱并不随螺旋藻剂量的增加而增强, 因此合适的剂量是螺旋藻发挥调整腹泻小鼠菌群作用的重要因素。

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

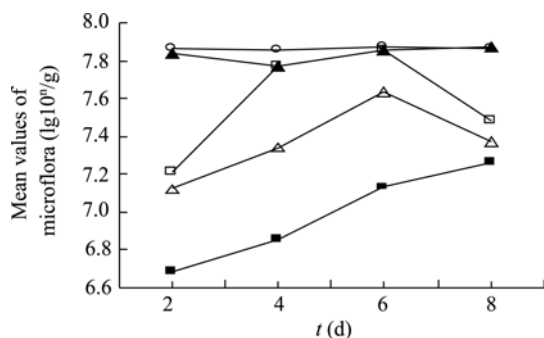


图3 双歧杆菌的动态变化

Fig. 3 The quantity change of *Bifidobacteria*

Note: —○—: Normal group; —■—: Saline group; —△—: Low dose group; —□—: Middle dose group; —▲—: High dose group. The below is same.

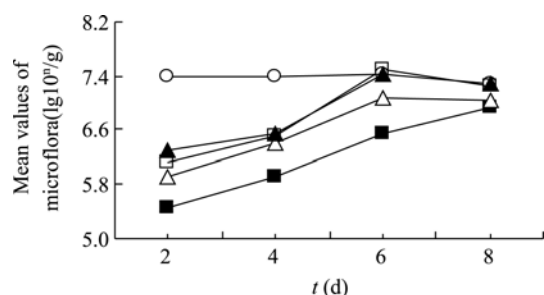


图4 乳杆菌的动态变化

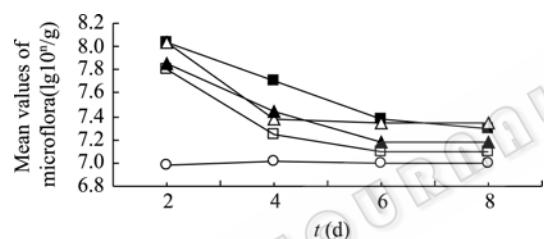
Fig. 4 The quantity change of *Bacterium lacticum*

图5 肠杆菌的动态变化

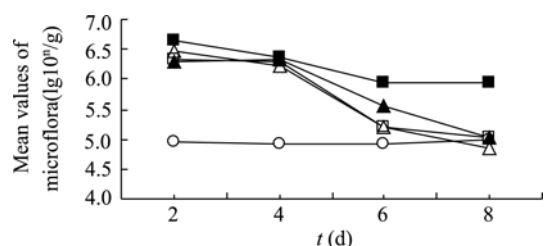
Fig. 5 The quantity change of *Enteric bacilli*

图6 肠球菌的动态变化

Fig. 6 The quantity change of *Enterococci*

3.3 灌胃螺旋藻后小鼠空回肠、盲肠、结肠的菌群变化情况

螺旋藻灌胃8d后,将各组小鼠拉颈椎处死,无菌条件下,取各肠段内容物进行细菌菌落计数,结果见表2~表4。

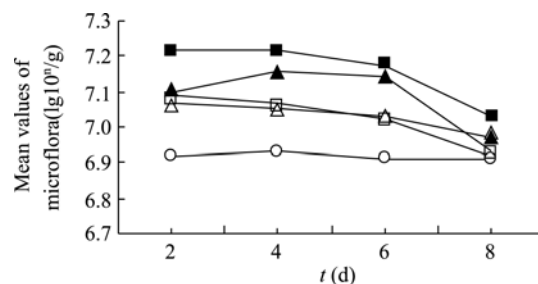


图7 拟杆菌的动态变化

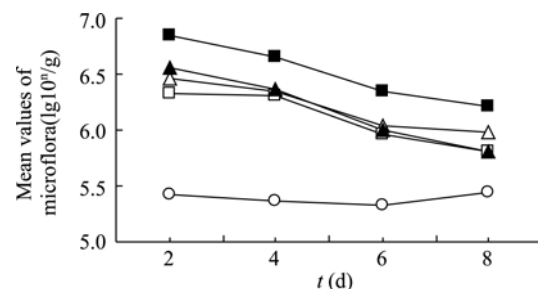
Fig. 7 The quantity change of *Bacteroid*

图8 产气荚膜梭菌的动态变化

Fig. 8 The quantity change of *Clostridium perfringens*

结果显示,空回肠段各菌群数量明显低于盲肠、结肠肠段菌群数量,盲肠、结肠肠段各菌群数量与粪便菌群数量接近,但各菌群数量均低于粪便中菌群数量。由表2可知,灌胃螺旋藻各组空回肠的双歧杆菌、乳杆菌总体上高于生理盐水组,肠杆菌、肠球菌、拟杆菌、产气荚膜梭菌均低于生理盐水组。由表3、4可知,灌胃螺旋藻各组盲肠、结肠的菌群变化与空回肠菌群变化趋势相同。由各表比较可知,各肠段菌群的变化趋势与粪便中菌群变化趋势基本一致,但在数量级上有明显差别。这说明,粪便样品在一定程度上能够反映肠道菌群的变化趋势,但不能真实的反映各肠道菌群的准确数量。

4 讨论

螺旋藻中含有优质的蛋白质、碳水化合物、丰富的不饱和脂肪酸、维生素、矿物质和其它活性成分,是细菌生长的理想的营养源。螺旋藻有促进乳酸菌增殖的作用^[7-9],我们在实验中也证明中高剂量的螺旋藻可显著增殖双歧杆菌和乳杆菌($P < 0.01$),这与周熙成等^[10]研究螺旋藻对肠道菌群体外生长有促进作用所得结果相一致,螺旋藻可能含有一种促进乳酸菌生长的因子,类似于益生元的物质存在,但究竟是什么成分起作用,是否含有类似益生元物

表 2 小鼠空回肠菌群均值($\bar{x}\pm s$) ($\lg 10^3/\text{g}$)
Table 2 The mean values of intestinal microflora in jejunum and ileum ($\bar{x}\pm s$) ($\lg 10^3/\text{g}$)

组别 Group	双歧杆菌 <i>Bifidobacteri a</i>	乳杆菌 <i>Bacterium lactic m</i>	肠杆菌 <i>Enteric bac, li</i>	肠球菌 <i>Enterococc</i>	拟杆菌 <i>Bacteroi</i>	产气荚膜梭菌 <i>Clostridium perfringen</i>
正常组 Normal group	5.46±0.06	5.26±0.07	3.65±0.08	2.05±0.23	4.25±0.3	4.04±0.07
生理盐水组 Saline group	4.19±0.06	4.39±0.04	5.39±0.09	3.86±0.12	5.39±0.0	4.13±0.09
低剂量组 Low dose grou	4.22±0.04*	4.46±0.09**	4.92±0.06*	3.89±0.07*	4.74±0.02**	3.96±0.05*
中剂量组 Middle dose gro p	5.24±0.05*	5.09±0.07**	4.40±0.08*	3.54±0.14*	4.39±0.08**	3.96±0.05*
高剂量组 High dose grou	5.62±0.08*	4.99±0.34**	4.20±0.04*	3.24±0.06*	4.15±0.07**	3.95±0.04*

注: 与生理盐水组相比, **: $P<0.01$; *: $P<0.05$; 下同

Note: Compared to saline group, **: $P<0.01$, *: $P<0.05$; The same below

表 3 小鼠盲肠菌群均值($\bar{x}\pm s$) ($\lg 10^3/\text{g}$)
Table 3 The mean values of intestinal microflora in caecum ($\bar{x}\pm s$) ($\lg 10^3/\text{g}$)

组别 Group	双歧杆菌 <i>Bifidobacteri a</i>	乳杆菌 <i>Bacterium lactic m</i>	肠杆菌 <i>Enteric bac, li</i>	肠球菌 <i>Enterococc</i>	拟杆菌 <i>Bacteroi</i>	产气荚膜梭菌 <i>Clostridium perfringen</i>
正常组 Normal group	7.36±0.08	6.74±0.06	5.85±0.06	3.16±0.14	5.85±0.0	4.72±0.08
生理盐水组 Saline group	6.39±0.10	5.38±0.10	6.43±0.13	5.13±0.11	6.43±0.1	5.19±0.11
低剂量组 Low dose grou	6.44±0.09*	6.35±0.07**	6.49±0.14	4.46±0.09*	6.38±0.46*	4.47±0.09*
中剂量组 Middle dose gro p	6.89±0.07*	6.75±0.13**	6.18±0.11*	4.44±0.02*	5.91±0.05*	4.42±0.06*
高剂量组 High dose grou	6.92±0.04*	6.81±0.04**	5.24±0.04*	4.38±0.03*	5.87±0.07*	4.38±0.07*

表 4 小鼠结肠菌群均值($\bar{x}\pm s$) ($\lg 10^3/\text{g}$)
Table 4 The mean values of intestinal microflora in colon ($\bar{x}\pm s$) ($\lg 10^3/\text{g}$)

组别 Group	双歧杆菌 <i>Bifidobacteri a</i>	乳杆菌 <i>Bacterium lactic m</i>	肠杆菌 <i>Enteric bac, li</i>	肠球菌 <i>Enterococc</i>	拟杆菌 <i>Bacteroi</i>	产气荚膜梭菌 <i>Clostridium perfringen</i>
正常组 Normal group	7.12±0.09	6.25±0.02	6.61±0.08	2.98±0.14	6.12±0.0	5.46±0.07
生理盐水组 Saline group	6.27±0.03	6.03±0.06	7.17±0.06	5.88±0.03	6.80±0.0	5.57±0.07
低剂量组 Low dose grou	6.45±0.05*	6.70±0.02**	7.09±0.08*	5.14±0.12*	6.53±0.05**	5.37±0.06*
中剂量组 Middle dose gro p	6.98±0.03*	7.11±0.07**	5.73±0.03*	4.92±0.02*	5.42±0.05**	5.32±0.08*
高剂量组 High dose grou	6.83±0.06*	7.11±0.09**	5.18±0.37*	2.99±0.08*	4.29±0.10**	3.28±0.15*

质还需要进一步的分析和实验。

实验中还发现灌胃螺旋藻 8 d 后对有肠杆菌、肠球菌、拟杆菌、产气荚膜梭菌数量有明显抑制作

用($P<0.01$), 分析可能是造腹泻模型后, 正常菌群严重失调, 灌胃螺旋藻后, 有益菌双歧杆菌和乳杆菌快速增殖, 抑制其他菌群的异常增殖, 逐渐建立起

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

新的肠道平衡。

由于受到动物模型费用高,费时长,无法连续检测的限制,在研究过程中一直使用直接采取粪便的方法,间接反应肠道菌群的变化情况,实验中证明粪便样品在一定程度上能够反映肠道菌群的变化趋势,但不能真实的反映各肠道菌群的准确数量。

参 考 文 献

- [1] Tsuchihashi N. Effect of spirulina platensis on caecum content in rats. *Bull, Chilba Hygiene College, Chilba Japa*: 1987, **5**: 27-30.
- [2] 马淑霞, 杨景云, 刘君星, 等. 螺旋藻对抗生素脱污染小鼠肠道菌群的影响. *中国微生态学杂志*, 1999, **11**(2): 79.
- [3] 王力宁, 蔡晓静, 黄小琪, 等. 抗复感合剂对抗生素脱污染小鼠肠道菌群影响的研究. *广西中医药*, 2006, **29**(6): 47-49
- [4] 梁 冰, 吴力克, 房 芳, 等. 螺旋藻制剂调节实验性肠菌群失调症药效学研究. *中国海洋药物*, 2002, **1**: 29-33.
- [5] 罗学娅, 伦永志, 高 卫, 等. 嗜酸性乳杆菌培养上清液对抗生素相关性腹泻小鼠肠道菌群的影响. *世界华人消化杂志*, 2006, **14**(19): 1870-1873.
- [6] 徐致远, 郭本恒, 王荫榆, 等. 植物乳杆菌 ST- 对小鼠肠道菌群的调节. *中国乳品工业*, 2006, **2**(34): 11-12
- [7] Gloria Zulpol de Caire, Luis Parada. Effect of spirulina platensis biomass on the growth of lactic acid bacteria in milk. *World Microbiol Biotchnol*, 2000, **16**: 563-565.
- [8] Parada JL, Glo ria Zulpa de caire. Lactic acid bacteria grow the promoters from spirulina platensis. *Internati Food Microbiol*, 1998, **45**(3) : 225-228.
- [9] V arga L Szigeti J O rdog V. Effect of a Spirulina platensis biomass and that of its active components on single strains of dairy starter cultures. *Milchw issenschaft*, 1999, **54** (4) : 187-190.
- [10] 周熙成, 白树民, 梁 明. 螺旋藻及其水提物对肠道菌群体外生长的影响. *中国微生态杂志*, 2000, **14**(5): 256-257.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一,主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展,其内容要求新颖丰富,观点明确,论述恰当,应包含作者自己的工作内容和见解。因此,作者在动笔之前必须明确选题,一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面,在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势,即掌握其内在的精髓,深入到专题研究的本质,论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望,提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外,作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法,辅以注释,客观而有少量评述,使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是:在专论与综述中引用的文献应该主要是近5年国内外正式发表的研究论文,引用文献数量不限。