

研究报告

野生蓝莓和花青素提取物对高脂饮食
小鼠肠道菌群的影响杨晗¹ 孙晓红^{1*} 吴启华² 赵勇¹ 潘迎捷¹

(1. 上海海洋大学 食品学院 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心 上海 201306)

(2. School of Food and Agriculture, University of Maine, Maine 04469-5735, USA)

摘要:【目的】研究野生蓝莓和花青素提取物对高脂饮食小鼠肠道菌群的影响。【方法】采用高脂饲料喂养 C57BL/6 小鼠,同时膳食补充野生蓝莓或花青素提取物,将 25 只无菌小鼠分为 5 组:正常对照组(Normal chow diet, NCD),普通饲料+10 g/100 g 蓝莓组(NCD+BB),高脂饲料组(High-fat diet, HFD),高脂饲料+10 g/100 g 蓝莓组(HFD+BB),高脂饲料+20 mg/100 g 花青素组(HFD+ACN),饲养 10 周,每周对其食物摄入量、能量摄入量以及体重进行测定,并运用 DGGE 方法对小鼠肠道菌群结构变化进行动态监测。【结果】各实验组食物摄入量无显著性差异,HFD+BB 组和 HFD+ACN 组能量摄入量均明显高于 NCD+BB 组。虽然 HFD+BB 组体重增加最为明显,但 10 周末时 HFD+BB 组体重与其他各组无显著差异。随着实验的进行,HFD 组、HFD+BB 组和 HFD+ACN 组肠道微生物多样性发生明显变化。HFD+BB 组与 NCD 组菌群差异最大,HFD+ACN 组与 NCD 组肠道菌群 DGGE 图谱相似性系数明显高于 HFD 组,对优势条带测序结果显示膳食补充蓝莓或花青素提取物可明显降低肥胖相关细菌 *Firmicutes* 的数量。【结论】蓝莓和花青素提取物可改善由高脂饮食引起的肠道微生态失调,调节肠道菌群结构,具有潜在的减肥消脂功能。

关键词: 蓝莓, 花青素, 肠道菌群

Influence of dietary wild blueberry and anthocyanins extract
on intestinal microorganisms in high-fat diet-induced miceYANG Han¹ SUN Xiao-Hong^{1*} WU Vivian Chi-Hua² ZHAO Yong¹ PAN Ying-Jie¹

(1. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing and Preservation, College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

(2. School of Food and Agriculture, University of Maine, Maine 04469-5735, USA)

Abstract: [Objective] The influence of wild blueberry and anthocyanins extract on gut microbiota of high-fat diet-induced C57BL/6 mice was investigated. [Methods] The C57BL/6 mice were fed with high-fat diet and supplemented with blueberry or anthocyanins extract. Twenty-five germ-free mice

基金项目: 上海市教育委员会科研创新项目(No. 11YZ159); 上海市科学技术委员会部分地方院校能力建设项目(No. 113105011000); 上海市科委工程中心建设项目(No. 11DZ2280300)

*通讯作者: Tel: 86-21-61900503; 邮箱: xhsun@shou.edu.cn

收稿日期: 2014-04-27; 接受日期: 2014-06-18; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-06-19

were divided into five groups: normal chow diet (NCD), NCD+10 g/100 g blueberry (NCD+BB), high-fat diet (HFD), HFD+10 g/100 g blueberry (HFD+BB), HFD+20 mg/100 g anthocyanin (HFD+ACN). During the ten weeks, food intake, caloric intake and body weight were measured weekly, and dynamic changes of intestinal flora were monitored by DGGE. [Results] There was no significant difference in food intake among these five groups. Average caloric intake was higher in mice fed HFD+BB and HFD+ACN diets compared to the NCD+BB diets. Although body weight gain of mice fed with HFD+BB increased most obviously, no significant difference in body weight was observed between the groups at ten weeks. As the research went on, the diversity of intestinal microorganisms in HFD group, HFD+BB group and HFD+ACN group changed dramatically. The similarity coefficients of PCR-DGGE profile in intestinal flora between HFD+BB group and NCD group was lowest. However, as for HFD+ACN group and NCD group, the value is higher compared with HFD group and NCD group. The sequencing results of the dominant bands revealed that dietary supplemented with blueberry or anthocyanins extract can significantly reduce the number of obesity-associated *Firmicutes*. [Conclusion] Wild blueberry and anthocyanins extract can modify the structure of the intestinal microbiota, simultaneously protect against imbalanced intestinal microorganisms of the high-fat diet-induced mice, and ameliorate obesity and attenuate lipid accumulation potentially.

Keywords: Blueberry, Anthocyanin, Intestinal microorganisms

近年来,肥胖已成为世界范围内最受关注的代谢类疾病之一。研究表明,肥胖可改变肠道菌群结构组成,降低肠道菌群多样性,使厚壁菌门丰度增加,导致拟杆菌门比例下降^[1]。同时肠道菌群也可以提高宿主从食物中摄取能量的效率、控制脂肪代谢、引发全身性的慢性低度炎症,作为环境因素诱发肥胖症和胰岛素抵抗^[2]。个体肠道微生物具有特异的代谢效能,而微生物构成的特定特征也可能诱发肥胖^[3]。

由于肠道中的细菌大多数为专性厌氧菌,即使在严格厌氧的条件下,仍有60%左右的菌不能培养,因此非培养的分子生物学技术在肠道微生物多样性研究方面得到了广泛应用。由于变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术可以很好地反映微生物区系的遗传多样性和优势菌群,因此,广泛应用于肠道微生物多样性研究。

野生蓝莓(Blueberry, BB)中富含多种多酚类物质,例如黄酮醇类、酚酸以及花青素等,具有抗氧化、抗衰老、抗肿瘤及抗感染等多重功效。花青素(Anthocyanins, ACN)作为一种天然食用色素,能改善视力^[4],杀灭食源性病原体^[5],预防自由基引发的癌症和多种心脑血管疾病,也可加强有益乳杆菌

生长^[6]。研究证明,蓝莓和桑葚中的花青素均可改善由高脂饮食引起的肥胖和血脂异常,增加肠道内双歧杆菌数量^[7],黑米花青素可使肠球菌和肠杆菌数量明显降低^[8],促进肠道健康。但对于花青素的减肥机理以及是否与调节肠道菌群有关尚未见相关报道。为了探究蓝莓和花青素的减肥消脂功能,本研究选择C57BL/6雄性小鼠为研究对象,通过高脂饲料喂养,同时膳食补充蓝莓或花青素提取物,研究蓝莓和花青素对小鼠肠道菌群组成和结构的改善调节作用,分析探索它们的减肥作用机制,为蓝莓功能性食品的进一步研究开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料和试剂:野生蓝莓(*Vaccinium uliginosum*)购自黑龙江省塔河绿野山产品有限公司,保存于-20℃。甲醇、98%甲酸,国药集团化学试剂有限公司;Amberlite® XAD-7HP大孔树脂,美国Sigma公司;粪便基因组DNA提取试剂盒、pGM-T克隆试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;PCR引物、去离子甲酰胺、尿素、50×TAE、1×TE Buffer,上海生工生物工程技术有限公司;SYBR Green I

核酸染料, 北京索莱宝科技有限公司; *Taq* DNA 酶、dNTPs Mixture、10×PCR Buffer, 宝生物工程(大连)有限公司; AxyPrep PCR 清洁试剂盒, 美国 Axygen 公司; LB 琼脂培养基、LB 液体培养基, 北京陆桥技术有限公司。

1.1.2 仪器与设备: 5424 高速离心机、6325 PCR 仪, 德国 Eppendorf 公司; PL2002 电子天平, 瑞士 Mettler Toledo 仪器有限公司; GelDocXR 凝胶成像仪、D-code System 电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; Synergy2 多功能酶标仪, 美国 BioTek 公司; Christ Alpha 2-4 LD 冷冻干燥机, 德国 Christ 公司; CR21G 高速冷冻离心机, 日本 Hitachi 公司。

1.2 方法

1.2.1 野生蓝莓中花青素的提取: 花青素提取参照 Prior 等^[9]的方法, 稍作改进。将蓝莓冻果解冻匀浆并冷冻干燥成粉末, 取 120 g 粉末, 加入 1.8 L 甲醇:水:甲酸(85:15:0.5, 体积比), 漩涡 30 s, 超声 5 min, 超声过程中振荡 2 次, 使得样品重悬, 静置 5 min, 漩涡 30 s, 静置 5 min, 5 500 r/min 离心 10 min, 收集上清。再用 1.2 L 甲醇:水:甲酸(85:15:0.5, 体积比)提取 3–5 次, 直到残渣中颜色不再改变为止, 将两次所得上清液混合, 滤纸过滤, 以除去残渣, 旋转蒸发去除甲醇。将所得提取液装入 Amberlite® XAD-7HP 大孔树脂中, 用 2–3 倍体积 0.5% 甲酸水溶液饱和吸附柱, 再用 0.5% 甲酸甲醇洗脱, 回收花青素, 旋转蒸发去除甲醇, 乙酸乙酯萃取 3 次, 以除去酚酸, 旋转蒸发, 收集花青素, 并置于–20 °C 保存。

1.2.2 花青素提取物浓度的测定: 取制备的样品 1 mL, 加入 0.025 mol/L 氯化钾缓冲溶液(pH 1.0)或 0.4 mol/L 醋酸钠缓冲溶液(pH 4.5) 4 mL, 转入比色皿后, 用紫外-可见分光光度计分别以 520 nm 和 700 nm 为吸收波长测定其吸光值。

用式(1)计算吸光值 A :

$$A=(A_{525}-A_{700})_{\text{pH } 1.0}-(A_{525}-A_{700})_{\text{pH } 4.5} \quad (1)$$

用式(2)计算花青素含量:

$$\text{花青素含量}(\text{mg/L})=(A \times M \times DF \times 1\,000)/(\varepsilon \times 1) \quad (2)$$

其中, A : 吸光值, 由式(1)计算得到; M : 矢车

菊色素-3-O-葡萄糖苷的相对分子质量(449.2 g/mol); DF : 稀释因子; ε : 矢车菊色素-3-O-葡萄糖苷的消光系数[26 900 L/(cm·mol)]; 1: 比色皿宽度(1 cm)。

1.2.3 实验动物分组及样品采集: 11 周龄的 C57BL/6 小鼠(购自中国科学院实验动物中心上海斯莱克实验动物有限责任公司) 25 只, 体重 22–26 g, 置于室温 18–25 °C, 相对湿度 50%–80% 条件下喂养, 每日光照 12 h, 各组自由进食饮水。

统一喂养正常饲料 7 d 后, 将小鼠随机分成 5 组, 每组 5 只, 正常对照组(Normal chow diet, NCD), 普通饲料+10 g/100 g 蓝莓组(NCD+BB)^[10], 高脂饲料组(High-fat diet, HFD), 高脂饲料+10 g/100 g 蓝莓组(HFD+BB), 高脂饲料+20 mg/100 g 花青素组(HFD+ACN)^[7]。其中普通饲料购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 高脂饲料由上海斯莱克实验动物有限责任公司制作, 两种饲料的主要营养成分及能量见表 1 和表 2。将蓝莓果匀浆打碎后, 以 10 g/100 g 的含量与普通饲料或高脂饲料混合, 再进行冷冻干燥, 制得 10 g/100 g 蓝莓/普通饲料和 10 g/100 g 蓝莓/高脂饲料; 根据花青素提取液浓度计算所需提取液体积, 以 20 mg/100 g 的含量与高脂饲料混合, 再进行冷冻干燥, 制得 20 mg/100 g 花青素+高脂饲料。

每周测定小鼠体重和食物摄入量, 并以组为单位采集 0、5、8、10 周小鼠新鲜粪便样品, –80 °C 保存备用。

1.2.4 粪便细菌总 DNA 的提取: 称取上述采集的小鼠粪便样品 180–220 mg 至 2 mL 离心管中, 并置于冰上, 然后根据 TIANamp 粪便基因组 DNA 提取试剂盒提取粪便中的细菌 DNA, –20 °C 保存。

1.2.5 对 16S rDNA 基因 V3 区进行 PCR 扩增: 以提取的粪便基因组 DNA 为模板, 采用细菌通用引物 P2 (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')和 P3 (带 GC 夹子; 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3')^[11] 对 V3 区片段进行扩增。PCR 反应体系: 2.5 mmol/L dNTPs Mixture 2.0 μL, 10×PCR Buffer (Mg²⁺ Plus)

2.5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 引物各 1 μL , 5 U/ μL *Taq* 酶 0.125 μL , 模板 DNA (80–100 mg/L) 1 μL , ddH₂O 补足体积至 25 μL 。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。用 2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 获得的产物约为 200 bp 并用于 DGGE 电泳分析, 置于–20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

表 1 普通饲料和高脂饲料主要营养成分表 Table 1 The main composition and energy of normal diet and high-fat diet (g/100 g)		
主要成分 Main components	普通饲料 Normal chow diet	高脂饲料 High-fat diet
水分含量 Water content (%)	9.20	8.60
蛋白质 Protein (%)	22.10	18.80
脂肪 Fat (%)	5.28	16.20
灰分 Ash content (%)	5.20	5.20
纤维 Fiber (%)	4.12	3.98
无氮浸出物 Nitrogen-free-extract (%)	52.00	45.20
赖氨酸 Lysine (%)	1.34	1.38
蛋氨酸+胱氨酸 Methionine+Cysteine (%)	0.78	0.78
花青素 Anthocyanins (%)	0	0
总计 Total	100	100

表 2 普通饲料和高脂饲料主要物质供能表 Table 2 The main energy materials of normal diet and high-fat diet (kcal/100 g)		
供能物质 Energy materials	普通饲料 Normal chow diet	高脂饲料 High-fat diet
蛋白质 Protein	90.46	70.87
碳水化合物 Carbohydrate	212.96	170.55
脂肪 Fat	48.58	137.58
总计 Total	352.00	379.00

1.2.6 DGGE 电泳及染色: 对细菌 16S rDNA 基因 V3 区段的扩增产物进行 DGGE 分析。DGGE 条件为 8%聚丙烯酰胺凝胶浓度(丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺质量比为 37.5:1)。变性梯度范围是 40%–60% (100%变性剂含有 7 mol/L 尿素和 40%甲酰胺),PCR 扩增产物上样量为 15 μL , 在 1 \times TAE 缓冲液中, 在 60 V 的固定电压下电泳 16 h.电泳完毕后,用 SYBR Green I (1 \times TAE, 1:10 000)分两次染色, 每次染 15 min,倒掉染液,用去离子水冲洗,通过 GelDocXR 凝胶成像系统拍照, 用 Image Lab 软件分析图谱。

1.2.7 DNA 回收、克隆和测序: 用灭菌刀片将特征性条带割下, 分别装入 1.5 mL 的离心管中, 加入 30 μL 1 \times TE Buffer, 将离心管于 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜, 短暂离心, 以此为模板, 采用不带 GC 发夹结构的 P1 (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3')^[11] 和 P2 进行 PCR 扩增, 条件同 1.2.5。PCR 产物用 2%琼脂糖凝胶电泳检测, 再用 AxyPrep PCR 清洁试剂盒进行纯化。纯化后的产物连接至 pGM-T 载体, 转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞(自制)中, 在含有 X-gal、IPTG 和氨苄青霉素(Amp)的 LB 平板上进行蓝白斑筛选, 挑选白斑在含有 Amp 的 LB 液体培养基中过夜培养, 用 TIANamp 质粒小提试剂盒提取质粒, 并进行酶切验证, 质粒送到上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.2.8 数据及图像处理: 数据采用 Origin 8.0 作图软件和 SPSS 16.0 统计软件进行分析。DGGE 指纹图谱通过 Quantity One 4.6.2 软件, 采用 UPGMA 进行相似性聚类分析。

2 结果与讨论

2.1 野生蓝莓和花青素提取物对小鼠食物摄入量 and 体重的影响

在 10 周动物实验过程中,每日对 5 组 C57BL/6 小鼠分别饲喂普通饲料、普通饲料加蓝莓、高脂饲料、高脂饲料加蓝莓以及高脂饲料加花青素, 生长状况良好。图 1A 显示, 小鼠食物摄入量无显著性差异, 而在图 1B 中, NCD 组、HFD+BB 组和 HFD+ACN 组平均能量摄入量均明显高于 NCD+BB

组, HFD 组与其他各组都无显著性差异, 说明高脂饲料饲喂小鼠的食物摄入量与能量摄入量并未明显高于其他组。可能原因在于高脂饲料饲喂时间较短或供能较少, 有文献报道采用 35%高脂饲料(即 35%能量来源于脂肪)或者 45%高脂饲料, 但为避免脂肪含量过高动物不愿进食, 本文采用较为保守的 35%高脂饲料。

C57BL/6 小鼠体重如图 2A 所示, 由于随机分组时的系统误差, 造模开始前, HFD+BB 组体重显著低于其他 4 组, 且图 2B 证实 HFD+BB 组小鼠体重增长趋势最快。整个试验周期内, 与其他组相比, HFD+ACN 组体重一直偏高, 但可能受环境因素或

动物食欲影响, 第 5 周和第 9 周所有实验组小鼠体重均出现减少。到第 10 周末, NCD+BB 组体重明显低于 HFD+ACN 组和 HFD 组, 具有显著性差异。结果显示, 饲料中添加蓝莓的 HFD+BB 组和 NCD+BB 组与正常对照 NCD 组小鼠体重无显著性差异。从总体趋势来看, NCD+BB 组平均体重增加量均低于其他组, HFD+BB 组体重增加最为明显, 但第 10 周末 HFD+BB 组体重与其他各组无显著差异, 说明蓝莓虽然促进了高脂饮食小鼠的食欲, 但仍未造成实验动物的显著性肥胖, 可能原因是蓝莓富含多酚类物质和膳食纤维, 故可促进体内物质代谢吸收, 从而减少了脂肪堆积^[12]。

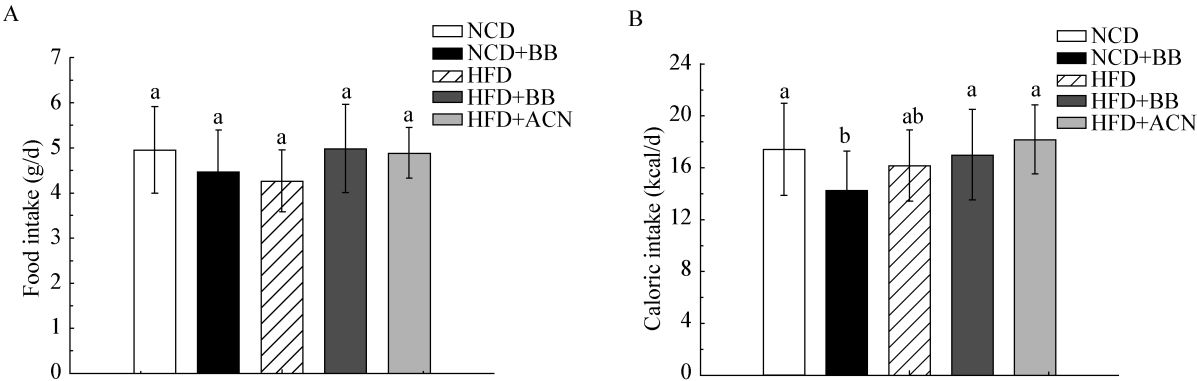


图 1 C57BL/6 小鼠食物摄入量和能量摄入量

Figure 1 Food intake and caloric intake for the male C57BL/6 mice

注: 上标字母表示该值与其他数值的显著性差异($P<0.05$).
Note: The means marked with superscript letters are significantly different relative to others ($P<0.05$).

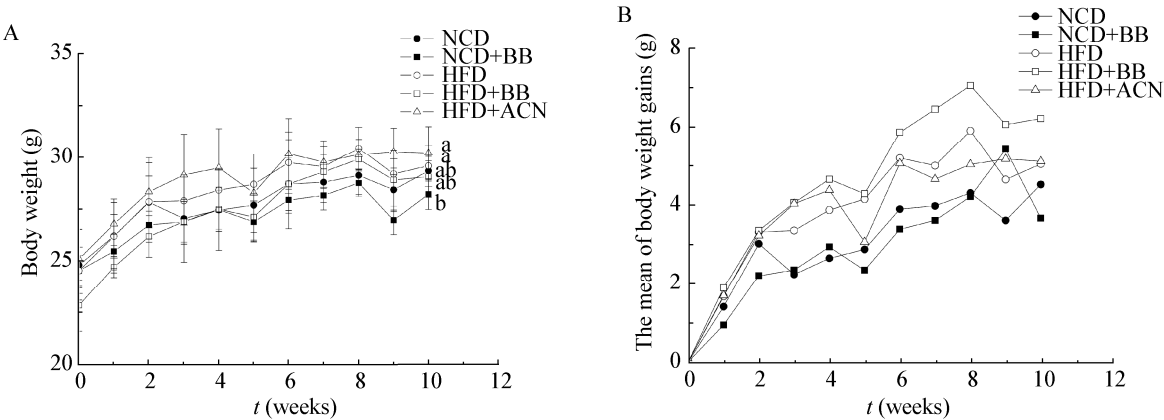


图 2 C57BL/6 小鼠体重和体重平均数增加量变化

Figure 2 Changes in body weight and the mean of body weight gains for the male C57BL/6 mice

2.2 野生蓝莓和花青素提取物对小鼠肠道菌群多样性的影响

为了对小鼠肠道菌群结构变化进行动态监测,分析野生蓝莓和花青素提取物对小鼠肠道菌群多样性的影响,本文参照 Xie 等^[13]方法对 0、5、8、10 周粪便样品微生物群落变化进行 DGGE 分析。C57BL/6 小鼠肠道菌群 16S rRNA 基因 V3 区 DGGE 图谱、条带数量变化见图 3 和表 3,结果表明,0 周时,5 组条带数量较多,实验动物微生物多样性较为丰富。到 5 周时,NCD+BB 组和 HFD+BB 组条带数量较多,说明膳食补充蓝莓可增加肠道微生物多样性,表明其具有潜在的保健作用。随着实验的进行,HFD 组、HFD+BB 组和 HFD+ACN 组条带出现明显减少,多样性降低,但后两者条带数多于 HFD 组,说明虽然高脂饲料能使肠道微生物多样性发生显著变化,但蓝莓或花青素可改善由高脂

饮食引起的肠道微生态失调。

C57BL/6 小鼠肠道菌群 16S rDNA 基因扩增产物 DGGE 图谱聚类分析和相似系数见图 4 和表 4,据文献[14]中的评价方法可知,0 周时,其他处理组与对照组 NCD 表现为中等相似或极相似,说明实验开始初期,各组肠道菌群组成相似度较高。实验进行到 8 周时,NCD+BB 与 NCD 组极相似,同时,HFD、HFD+BB 与 HFD+ACN 三组饲喂高脂饲料组肠道菌群也表现为极相似。10 周末 HFD+BB 组与 NCD 组菌群差异最大,说明虽然 HFD+BB 组体重与其他各组无显著差异,但肠道菌群组成却发生偏移,体重增长趋势较快,造成菌群组成发生显著变化,而 HFD+ACN 组与 NCD 组肠道菌群 DGGE 图谱相似性系数明显高于 HFD 组,说明花青素对由高脂饮食诱导的肠道菌群具有正向调节作用。

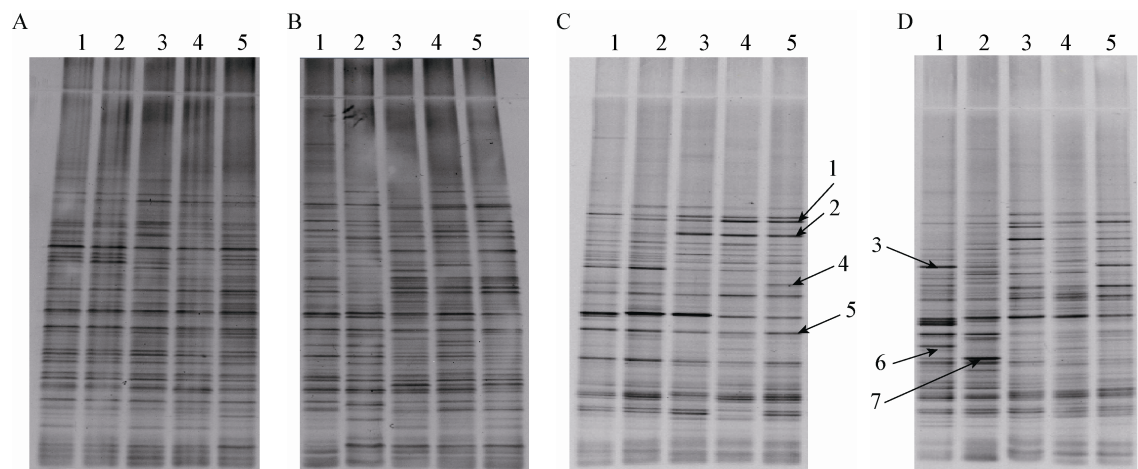


图3 0周(A)、5周(B)、8周(C)、10周(D)时 C57BL/6 小鼠肠道菌群 16S rRNA 基因扩增产物 DGGE 图谱
Figure 3 DGGE profile of 16S rRNA gene amplified products of intestinal flora of C57BL/6 mice at 0 week (A), 5 weeks (B), 8 weeks (C), 10 weeks (D)

Note: 1: NC; 2: NC+BB; 3: HFD; 4: HFD+BB; 5: HFD+ACN.

表3 C57BL/6 小鼠肠道菌群条带数量变化 Table 3 Change in bands of intestinal flora in C57BL/6 mice					
时间 Time (weeks)	NCD	NCD+BB	HFD	HFD+BB	HFD+ACN
0	22	21	22	20	24
5	20	23	22	27	20
8	10	20	19	21	19
10	22	21	17	19	20

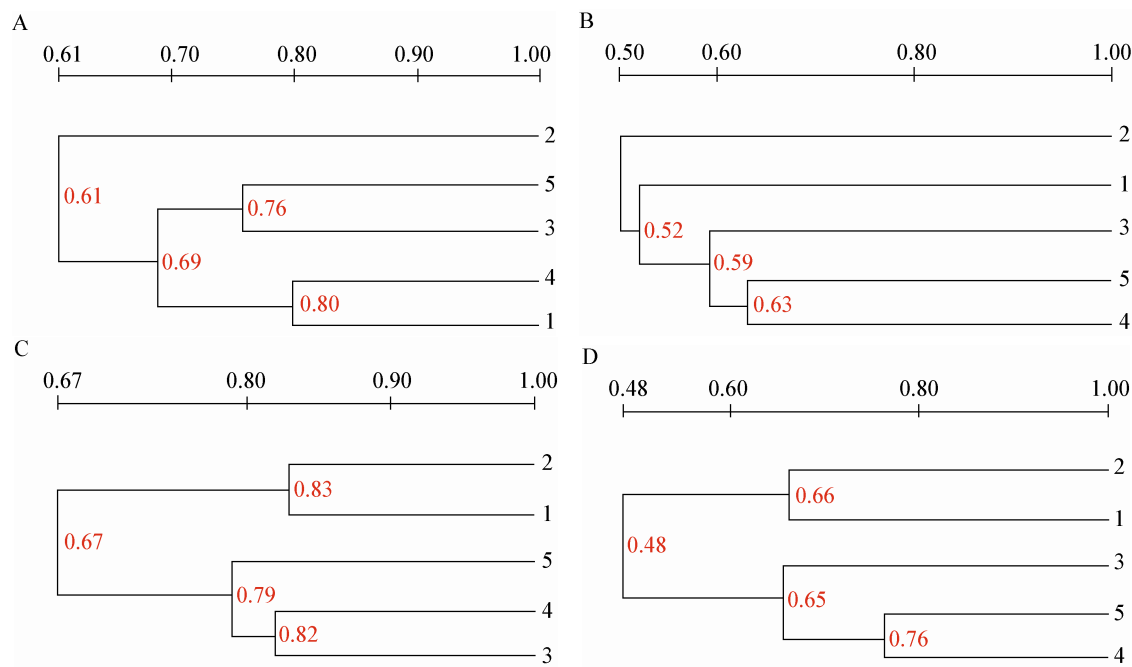


图 4 0 周(A)、5 周(B)、8 周(C)、10 周(D)时刻 C57BL/6 小鼠肠道菌群 16S rRNA 基因扩增产物 DGGE 图谱聚类分析

Figure 4 DGGE profile cluster analysis of 16S rRNA gene amplified products of intestinal flora of C57BL/6 mice at 0 week (A), 5 weeks (B), 8 weeks (C), 10 weeks (D)

表 4 C57BL/6 小鼠肠道菌群的 PCR-DGGE 图谱的相似性系数						
Table 4 Similarity coefficients of PCR-DGGE profile of intestinal flora of C57BL/6 mice						
时间 Time (weeks)	组别 Group	NCD	NCD+BB	HFD	HFD+BB	HFD+ACN
0	NCD	100.0				
	NCD+BB	57.7	100.0			
	HFD	61.7	59.2	100.0		
	HFD+BB	79.5	63.2	72.0	100.0	
	HFD+ACN	71.0	63.5	76.1	72.9	100.0
5	NCD	100.0				
	NCD+BB	45.1	100.0			
	HFD	55.8	50.9	100.0		
	HFD+BB	55.6	53.5	60.1	100.0	
	HFD+ACN	46.0	52.0	57.9	63.0	100.0
8	NCD	100.0				
	NCD+BB	82.6	100.0			
	HFD	70.2	73.4	100.0		
	HFD+BB	61.1	64.6	82.2	100.0	
	HFD+ACN	68.4	65.7	80.2	77.8	100.0
10	NCD	100.0				
	NCD+BB	66.2	100.0			
	HFD	42.7	44.7	100.0		
	HFD+BB	40.2	52.1	68.6	100.0	
	HFD+ACN	50.7	56.1	61.5	76.3	100.0

表 5 DGGE 条带分离的主要细菌 16S rRNA 基因部分序列相似性比较
Table 5 Similarity between partial 16S rRNA gene fragments of dominant bacteria from DGGE bands and those published in GenBank

条带 Band	菌株 Closest relative	相似性 Identity (%)	登录号 Accession No.
1	Uncultured bacterium	100	JX012758.1
2	<i>Firmicutes</i>	99	GU954564.1
3	<i>Helicobacter pullorum</i>	100	AJ876513.1
4	<i>Clostridium</i> sp.	100	KF931641.1
5	Uncultured bacterium	99	KC856777.1
6	Uncultured bacterium	100	JX509396.1
7	Uncultured bacterium	99	EF701791.1

2.3 DGGE 特征性条带序列分析

对 DGGE 图谱中的特征性条带进行割胶分析得出, 1、2 和 4 号条带在 8 周末时 HFD、HFD+BB、HFD+ACN 三种饲喂高脂饲料的小鼠肠道中信号变强, 说明饲喂高脂饲料可促进这 3 种菌在肠道内的繁殖, 测序结果表明, 1 号与从环境或肠道分离出的 *Uncultured bacterium* 相似性为 99%(表 5), 并与炎症性肠炎、肥胖、II 型糖尿病等代谢类疾病有关。2 号和 4 号与 *Firmicutes* 和 *Clostridium* sp.相似性分别为 100%和 99%, 其中 *Firmicutes*, 属于厚壁菌门菌。8 周末时 3 组高脂饲料组中 *Firmicutes* 条带信号增强, 而 10 周末时 HFD+BB 组和 HFD+ACN 组信号减弱, 同时, 与 8 周末时相比, 两组小鼠体重出现不同程度的降低。据报道^[15], 在肥胖患者体内 *Bacteroidetes*/*Firmicutes* 比值降低, 而患者体重减轻时, 该比值升高, 说明蓝莓和花青素可降低肥胖动物肠道菌群中 *Firmicutes* 数量, 从而具有潜在的减肥消脂功能。此外, *Clostridium* sp.为梭状芽孢杆菌属, Liszt 等^[16]研究表明, 素食主义者肠道内 *Clostridium* cluster IV 明显偏低, 本实验中虽然 HFD+BB 组平均体重增加量最高, 但该组中 *Clostridium* sp.条带信号比 HFD 组偏弱, 进一步表明蓝莓具有促进人体肠道健康的功能, 但 HFD+ACN 组该菌含量最多, 与文献报道结果不一致, 仍需深入研究。10 周末时 NCD 组和 HFD+ACN

组中 *Helicobacter pullorum* 含量出现异常增高, 推测这两组小鼠可能患有炎症性肠炎, 可能由环境因素造成。同时, NCD 组的 6 号条带, NCD 组和 NCD+BB 组的 7 号条带均出现信号增强, 他们都是可从环境或粪便中分离出的 *Uncultured bacterium*, 相似性分别为 100%和 99%, 与肥胖或健康的关系有待进一步的研究。

3 结论

本研究证明, 35%高脂饲料无法在短期内获得成功的肥胖 C57BL/6 小鼠模型, 但其可显著影响肠道微生物多样性, 导致肠道微生态失调。同时膳食补充蓝莓和花青素提取物可明显降低肥胖相关细菌 *Firmicutes* 的数量, 从而对高脂饮食饲喂小鼠的肠道菌群起到积极的调节作用, 提示蓝莓和花青素具有潜在的减肥消脂功能。

参考文献

[1] Jumpertz R, LeDS, Turnbaugh PJ, et al. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2011, 94(1): 58-65

[2] Fleissner CK, Huebel N, Abd El-Bary MM, et al. Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet-induced obesity[J]. British Journal of Nutrition, 2010, 104(06): 919-929

[3] Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut[J]. Science, 2001, 292(5519): 1115-1118

[4] Kalt W, Blumberg JB, McDonald JE, et al. Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(3): 705-712

[5] Côté J, Caillet S, Doyon G, et al. Antimicrobial effect of cranberry juice and extracts[J]. Food Control, 2011, 22(8): 1413-1418

[6] Lacombe A, Li RW, Klimis-Zacas D, et al. Lowbush wild blueberries have the potential to modify gut microbiota and xenobiotic metabolism in the rat colon[J]. Public Library of Science, 2013, 8(6): e67497

[7] Wu T, Qi X, Liu Y, et al. Dietary supplementation with purified mulberry (*Morus australis* Poir) anthocyanins suppresses body weight gain in high-fat diet fed C57BL/6 mice[J]. Food Chemistry, 2013, 141(1): 482-487

[8] Li S, Chen W, Liu H, et al. Effect of black rice anthocyanins on intestinal flora and antioxidant capacity in rats[J]. Chengdu Medical College, 2011, 6(3): 219-221 (in Chinese)
李帅, 陈玮, 刘洪, 等. 黑米花青素对大鼠肠道菌群调节作用及抗氧化研究[J]. 成都医学院学报, 2011, 6(3): 219-221

[9] Prior RL, Wu X, Gu L, et al. Purified berry anthocyanins but not whole berries normalize lipid parameters in mice fed an obesogenic high fat diet[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2009, 53(11): 1406-1418

[10] Paturi G, Mandimika T, Butts CA, et al. Influence of dietary blueberry and broccoli on cecal microbiota activity and colon morphology in mdrla(-/-) mice, a model of inflammatory bowel diseases[J]. Nutrition, 2012, 28(3): 324-330

[11] Just N, Kirychuk S, Gilbert Y, et al. Bacterial diversity characterization of bioaerosols from cage-housed and floor-housed poultry operations[J]. Environmental Research, 2011, 111(4): 492-498

[12] Tuohy KM, Conterno L, Gasperotti M, et al. Up-regulating the human intestinal microbiome using whole plant foods, polyphenols, and/or fiber[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(36): 8776-8782

[13] Xie Y, Luo Z, Li Z, et al. Structural shifts of fecal microbial communities in rats with acute rejection after liver transplantation[J]. Microbial Ecology, 2012, 64(2): 546-554

[14] Pangloli P, Hung YC, Beuchat LR, et al. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 on produce by use of electrolyzed water under simulated food service operation conditions[J]. Journal of Food Protection, 2009, 72(9): 1854-1861

[15] Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity[J]. Nature, 2006, 444(7122): 1022-1023

[16] Liszt K, Zwielehner J, Handschur M, et al. Characterization of bacteria, clostridia and *Bacteroides* in faeces of vegetarians using qPCR and PCR-DGGE fingerprinting[J]. Annals of Nutrition and Metabolism, 2009, 54(4): 253-257

2015 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(2-1)

序号	会议名称	主办/协办单位	时间	人数	地点	联系方式
1	第二届国际重症休克与脓毒症高峰论坛	中国微生物学会微生物毒素专业委员会	3 月底	1500 人	广东 广州	张庆红 010-66867382 z_qinghong@aliyun.com
2	全国“发酵工程课程研讨会”	中国微生物学会生化过程模型化与控制专业委员会	4 月	120	上海	夏建业 jyxia@ecust.edu.cn
3	兽医微生物教学研讨	中国微生物学会兽医微生物学专业委员会	5 月	30	山东 泰安	13683505108
4	《海洋生物高技术丛书》分册 5:海洋微生物资源开发利用审稿会	中国微生物学会海洋微生物学专业委员会	5 月	30	山东 青岛	焦炳华
5	第六届传染病防控基础研究与应用技术论坛	中国微生物学会分析微生物专业委员会	6 月	300	待定	吕相征 lvxz@cma.org.cn
6	第十五届微生物学教学和科研及成果产业化研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会和普通微生物学专业委员会联合主办	7 月	200	新疆乌鲁木齐	努尔古丽·热合曼 nurgulum@163.com
7	第三届全国昆虫-微生物联合转化有机废弃物机制及资源化利用研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	7 月	150	山东 泰安	刘玉升 ysl8877@163.com