

## 研究报告

## 超微铁皮石斛对脾虚便秘小鼠肠道乳酸杆菌多样性的影响

赵兴兵<sup>1,2</sup> 谢雪姣<sup>1</sup> 吴维佳<sup>2</sup> 张华玲<sup>2</sup> 李丹丹<sup>1</sup> 余颜<sup>1</sup> 谭周进<sup>1\*</sup> 蔡光先<sup>1\*</sup>

(1. 湖南中医药大学 湖南 长沙 410208)

(2. 湖南省珍贵濒危药材工程研究中心 湖南 长沙 410007)

**摘要:**【目的】探讨超微铁皮石斛对脾虚便秘小鼠肠道乳酸杆菌多样性的影响, 为疗效提供依据。【方法】制备小鼠脾虚便秘模型, 灌胃铁皮石斛传统汤剂、超微 50%量汤剂治疗, 采集肠道内容物提取肠道微生物宏基因组 DNA, 用乳酸杆菌特异引物 PCR 后进行 ARDRA 分析。【结果】结果显示, 正常组、铁皮石斛传统汤剂组和超微 50%量汤剂组的 OTUs、Shannon 指数和 Brillouin 指数相同, 且均大于模型组; 铁皮石斛超微 50%量汤剂组与正常组乳酸杆菌群落结构的相似性系数最大, 为 0.333 3, 其次是模型组为 0.181 8, 传统汤剂组最小, 为 0.166 7; 聚类分析和主成分分析结果显示, 小鼠肠道乳酸杆菌多样性受脾虚便秘造模影响, 发生改变, 铁皮石斛两种汤剂通过不同的途径对其进行调控作用。【结论】铁皮石斛对脾虚便秘小鼠肠道乳酸杆菌多样性的调整作用明显, 且超微 50%量汤剂组小鼠肠道乳酸杆菌多样性更接近正常组, 疗效更优。

**关键词:** 小鼠, 脾虚便秘, 肠道微生物, 铁皮石斛, 乳酸杆菌, 分子多样性, ARDRA

## Effect of ultra-micro powder *Dendrobium officinale* on the molecular diversity of intestinal *Lactobacillus* in mice with spleen-deficiency constipation

ZHAO Xing-Bing<sup>1,2</sup> XIE Xue-Jiao<sup>1</sup> WU Wei-Jia<sup>2</sup> ZHANG Hua-Ling<sup>2</sup> LI Dan-Dan<sup>1</sup>  
SHE Yan<sup>1</sup> TAN Zhou-Jin<sup>1\*</sup> CAI Guang-Xian<sup>1\*</sup>

(1. Hunan University of TCM, Changsha, Hunan 410208, China)

(2. Hunan Engineering Research Center of Precious and Endangered Medicinal Materials, Changsha, Hunan 410007, China)

**Abstract:** [Objective] To provide the basis for its treatment, the effect of ultra-micro powder *Dendrobium officinale* on the molecular diversity of intestinal *Lactobacillus* in mice with spleen-deficiency constipation was studied. [Methods] The mice with spleen-deficiency constipation in treatment groups were respectively given the traditional decoction of *Dendrobium officinale* and 50% dose of ultra-micro powder *Dendrobium officinale*. The metagenome DNA of intestinal

基金项目: 长沙市科技局项目(No. k1307020-31); 湖南省培育发展战略性新兴产业专项引导资金(长财企指[2012]号)

\*通讯作者: Tel: 86-731-85381154

✉: 谭周进: tanzhjin@hotmail.com; 蔡光先: tanzhjin@sohu.com

收稿日期: 2013-11-27; 接受日期: 2014-01-20; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-02-20

microflora was extracted from intestinal contents. Then ARDRA analysis was made after PCR by specific primer of *Lactobacillus*. [Results] The results showed that OTUs, Shannon index and Brillouin index in the normal group, the traditional decoction group and the 50% dose of ultra-micro powder group were the same, and all were larger than which in the model group. Compared with *Lactobacillus* community structure in normal group, the similarity coefficient was 0.333 3 in the 50% dose of ultra-micro powder group, 0.181 8 in the model group, 0.166 7 in the traditional decoction group. The cluster analysis and principal components analysis suggested that molecular diversity of intestinal *Lactobacillus* in mice changed by the effect of spleen-deficiency constipation model, and the two kinds of decoction of *Dendrobium officinale* regulated it in different ways. The *Dendrobium officinale* had obvious effect on the molecular diversity of intestinal *Lactobacillus* in mice with spleen-deficiency constipation. [Conclusion] The efficacy of 50% dose of ultra-micro powder *Dendrobium officinale* was the best in all treatment groups, and the molecular diversity of intestinal *Lactobacillus* in 50% dose of ultra-micro powder *Dendrobium officinale* group was closer to the normal group.

**Keywords:** Mice, Spleen-deficiency constipation, Intestinal microbiota, *Dendrobium officinale*, *Lactobacillus*, Molecular diversity, ARDRA

便秘(Constipation)是一种常见的胃肠功能失调症,主要临床症状是排便困难、排便次数少、粪便干硬,整个消化道排空时间延长<sup>[1]</sup>。便秘人群易出现肠道菌群紊乱,严重影响人们的生活质量,长期便秘还与急性心脑血管疾病、痴呆、结直肠癌等有密切的关系<sup>[2-4]</sup>。铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)为兰科石斛属多年生草本植物,是石斛之极品,具有独特的药用价值。《本草纲目》中记载“主伤中,除痹,下气,补五脏虚劳羸弱,强阴,久服厚肠胃”<sup>[5]</sup>。有研究证实铁皮石斛对胃阴虚证病人大便干燥而致的便秘有很好的疗效,能软化大便,增强小肠推进运动<sup>[6]</sup>。

肠道微生物显著影响部分与肠道功能有关重要基因的表达,对肠道的健康发育及肠道功能的实现具有重要意义<sup>[7]</sup>。乳酸杆菌(*Lactobacillus*)是一类能够分解多种糖类产生大量乳酸的革兰氏阳性杆菌,在厌氧环境下生长好,广泛存在于人体和动物的口腔、泌尿生殖道、胃肠道内,是体内不可或缺的具有重要生理功能的益生菌<sup>[8]</sup>。乳酸杆菌已广泛应用于一些疾病治疗,可用于增强患者的免疫功能、预防感染、调整肠道菌群平衡等<sup>[9-11]</sup>。彭芝榕等<sup>[12]</sup>的研究发现,植物乳杆菌 F1208 对便秘大鼠具有润肠通便,促生长发育的作用,能够抑制肠道

肠球菌、肠杆菌的生长。刘晓梅等<sup>[13]</sup>的研究也证实乳酸杆菌均具有润肠通便的作用,并对维持肠道菌群平衡有较好功效。乳酸杆菌对于治疗便秘,维持肠道微生态的平衡具有重要意义。本文应用 PCR 技术与 RFLP 技术结合衍生而来的 ARDRA 技术<sup>[14-15]</sup>,进行小鼠肠道乳酸杆菌分子多样性的研究,将有助于揭示铁皮石斛对脾虚便秘的疗效机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 动物:** 20±2 g 清洁型昆明小鼠 24 只,雌雄各半,购于上海斯莱克斯实验动物有限公司。

**1.1.2 药物:** 取番泻叶(购于湖南中医药大学附属一医院,产自云南) 500 g,加 10 倍量沸水浸泡 10 min 后过滤,收集滤液在 75 °C 水浴中蒸发浓缩,制备成 100% (1 g/mL 生药)的水煎液<sup>[16]</sup>。4 °C 保存备用。

铁皮石斛常规细粉和超微粉由湖南龙石山铁皮石斛基地有限公司提供。称取适量铁皮石斛常规细粉,加入 100 倍体积的水浸泡 30 min,按常规方法先煎煮后浓缩,制备成浓度为 0.1 g/mL 的铁皮石斛传统汤药;称取适量超微铁皮石斛,加适量的开水冲泡 30 min,制备成超微铁皮石斛 50%量汤药,浓度为 0.05 g/mL。4 °C 保存备用。

**1.1.3 试剂:** 引物序列为正向引物 16S rRNA 基因通用引 7f [5'-AGAGTTTGAT(C/T)(A/C)TGGCTCAG-3'] 和反向引物 LAB-rev (5'-CTCAAACTAAA CAAAGTTTC-3')<sup>[17]</sup> 由北京鼎国昌盛生物技术有限公司合成。蛋白酶 K、溶菌酶、dNTPs、*Taq* 酶、高效离心柱型琼脂糖凝胶回收试剂盒和限制性内切酶 *Sam* I、*Hind* III、*Hha* I 和 *Rsa* I 均购于北京鼎国昌盛生物技术有限公司。其他试剂均为国产分析纯。0.1 mol/L PBS (pH 7.4)、Tris 缓冲液、0.5 mol/L EDTA、TE 缓冲液、10 g/L RNaseA、10% SDS、3 mol/L 乙酸钠、24:1 (体积比) 的氯仿异戊醇、70%乙醇、10×TBE 缓冲液、1%琼脂糖凝胶, 均参照文献[18-19]配制。

## 1.2 方法

**1.2.1 动物分组:** 实验小鼠在清洁安静的 SPF 动物房适应性饲养 2 d 后随机分成 4 组, 即正常组(6 只)、模型组(6 只)、铁皮石斛传统汤剂组(6 只)、铁皮石斛超微 50%量汤剂组(6 只), 雌性各半。

**1.2.2 造模方法:** 模型组正常饮水喂食, 且每天 2 次灌胃番泻叶水煎液 0.4 mL/(只·次), 连续 7 d, 造成脾虚模型; 第 8 天起停用番泻叶水煎液, 控制饮食, 隔天喂低纤维饲料生大米 4–8 g, 自由饮水一次, 0.5 h, 采用饥饱失常方法延续脾虚状态, 连续 8 d; 共 15 d, 制备小鼠脾虚便秘模型。正常组正常饮水喂食, 且前 7 d 需灌胃与番泻叶水煎液等量的生理盐水, 每天 2 次。参照文献[17]进行, 小鼠背毛枯槁失去光泽、倦卧、嗜睡、四肢疲软无力、拱背、消瘦、干瘪, 在持续上述脾虚症状的基础上, 大便数量减少、颗粒变小、变硬, 则造模成功。

**1.2.3 治疗:** 造模成功后, 根据《中国药典》(2010 年)<sup>[20]</sup> 中介绍铁皮石斛的临床等效用量, 铁皮石斛传统汤剂组和超微铁皮石斛 50%量汤剂组分别灌胃 0.25 mL/(只·次), 正常组和模型组分别灌胃等量的无菌水, 每天 2 次, 连续 7 d。

**1.2.4 小鼠肠道内容物的提取:** 治疗完成后, 将所有小鼠一次性全部颈椎脱臼处死并放于超净工作台上, 无菌采集各组盲肠段内容物, 同组每 2 只小

鼠的肠道内容物收集在一起, 通过无菌操作进行混匀, 每组共 6 只小鼠, 3 个重复。立即带回实验室, -20 °C 保存备用。

**1.2.5 肠道菌群宏基因组提取:** 肠道菌群宏基因组提取, 参照文献[18-19]进行。样品预处理, 取 2.0 g 样品于 50 mL 无菌离心管, 加入 30 mL 0.1 mol/L PBS 和 5–10 颗 0.3 mm 的无菌玻璃珠, 涡旋混匀, 200×g 离心 2 min 后取上清, 重复洗涤 2 次; 合并上清液, 10 000×g 离心 8 min, 收集沉淀; 沉淀依次用 PBS 洗涤 1 次、丙酮洗涤 2 次、PBS 洗涤 3 次后于 4 mL TE 缓冲液(pH 8.0)重悬, 备用。

取 500 μL 预处理后的菌悬液于 1.5 mL 无菌离心管, 加入 45 μL TE 缓冲液、5 μL 蛋白酶 K 和 20 μL 溶菌酶, 37 °C 反应 30 min 后加入 30 μL 10% SDS, 混匀, 37 °C 反应 40 min, 每 10 min 振摇一次。分别加入 100 μL 5 mol/L NaCl, 80 μL CTAB/NaCl, 混匀, 65 °C 反应 10 min。加入等体积 Tris-饱和酚: 氯仿: 异戊醇(25:24:1, 体积比), 10 000×g 离心 3 min, 取上清; 再加入等体积氯仿: 异戊醇(24:1, 体积比), 10 000×g 离心 3 min, 取上清, 重复操作一次。加入 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠及 2 倍体积无水乙醇, -20 °C 沉淀过夜。10 000×g 离心 10 min, 沉淀用 70%乙醇洗涤 1 次, 自然干燥后溶于 50 μL TE 缓冲液, -20 °C 保存备用。1%琼脂糖凝胶电泳、EB 染色、凝胶成像仪观察分析。

**1.2.6 肠道微生物宏基因组 DNA 乳酸杆菌特异引物 PCR:** PCR 扩增反应体系为: 10×*Taq* Buffer 5 μL, dNTPs Mixture (2.5 mmol/L) 4 μL, 7f (10 μmol/L) 1 μL, LAB-rev (10 μmol/L) 1 μL, *Taq* 酶(2.5 U/μL) 1 μL, 模板 DNA 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足至 50 μL。扩增程序为: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 52 °C 45 s, 72 °C 90 s, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳、EB 染色、凝胶成像仪观察分析。

**1.2.7 对 PCR 产物进行胶回收:** 按照高效离心柱型琼脂糖凝胶回收试剂盒“NEP025-1”说明书进行。

**1.2.8 PCR 产物限制性酶切片段分析:** 以 *Hha* I、

*Rsa* I、*Sam* I 和 *Hind* III 酶切 PCR 产物,反应体系为:PCR 产物 10 μL,ddH<sub>2</sub>O 12 μL,10×Buffer 2 μL,*Hha* I、*Rsa* I、*Sam* I 和 *Hind* III 酶各 2 μL。37 °C 反应 4 h 后经 1%琼脂糖凝胶电泳、EB 染色、凝胶成像仪观察分析。运用 Quantity One 软件进行条带分析,琼脂糖凝胶上 DNA 片段按“出现”记为“1”,“不出现”记为“0”,进行统计分析,DPS v7.05、NTSYS-PC 软件计算多样性指数和相似系数。

(1) Shannon 指数( $H'$ ):  $H'=-\sum_{i=1}^S(P_i \ln P_i)$

式中: $S$  为物种总数, $P_i$  为第  $i$  种物种个体数占群落总个数的比例。

(2) Brillouin 指数( $H$ ):  $H=\frac{1}{N} \ln \frac{N!}{n_1!n_2!n_3!}$

式中: $n_1$  为抽样中第 1 个物种的个体数量, $n_2$  为抽样中第 2 个物种的个体数量, $n_3$  为抽样中第 3 个物种的个体数量,依次类推, $N$  抽样中所有物种的个体总和。

(3) Czekanowski ( $C_s$ ):  $C_s=\frac{2j}{(a+b) \times 100}$

式中: $a$  为某一样品的酶切图谱的条带数目, $b$  为另一样品的酶切图谱的条带数目; $j$  为两个泳道所共有条带的数目。完全不同的两个图谱其相似系数为 0,而完全相同的 2 个图谱的相似系数为 1。

运用 SPSS 16.0 进行聚类分析和主成分分析。

2 结果与分析

2.1 肠道菌群宏基因组 DNA 乳酸杆菌特异引物 PCR 电泳图

如图 1 所示,经过正向引物即细菌通用引物 7f [5'-AGAGTTTGAT(C/T)(A/C)TGGCTCAG-3'] 和反向引物即乳酸杆菌特异引物 LAB-rev (5'-CTCAA AACTAAACAAAGTTTC-3')<sup>[17]</sup>,PCR 后得到的条带大小在 1 500 bp 左右,且条带稳定清晰。

2.2 肠道菌群宏基因组的乳酸杆菌 PCR 产物酶切后 ARDRA 分析

各组小鼠肠道菌群宏基因组 DNA 经乳酸杆菌

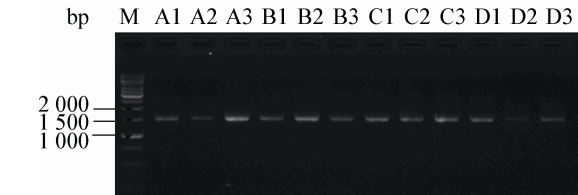


图 1 小鼠肠道乳酸杆菌 16S rRNA 基因 PCR 电泳图  
Figure 1 The intestinal *Lactobacillus* 16S rRNA gene PCR electrophoresis

注:正常组:A1、A2、A3;模型组:B1、B2、B3;铁皮石斛传统汤剂组:C1、C2、C3;铁皮石斛超微 50%量组:D1、D2、D3.  
Note: The control group: A1, A2, A3; The model group: B1, B2, B3; The traditional decoction of *Dendrobium officinale* group: C1, C2, C3; The 50% dose of ultra-micro powder of *Dendrobium officinale* group: D1, D2, D3.

特异引物 PCR 扩增后,产物经 *Hha* I、*Rsa* I、*Sam* I 和 *Hind* III 酶切,1%琼脂糖凝胶电泳,Quantity One 软件进行条带分析,结果见图 2。将每一个 16S rDNA 限制性片段长度多态性类型归纳为同一个 OTUs,OTUs 多样性能用以估计分离物中存在的最低限度的细菌种的数目。如表 1 所示,除模型组 OTUs 数为 5 外,其余 3 组 OTUs 数为 6。模型组与正常组有 1 条相同大小的条带,大小为 200 bp 左右;铁皮石斛传统汤剂组与正常组有 1 条相同大小的条带,在 700 bp 左右,无与模型组相同大小的条带;铁皮石斛超微 50%量汤剂组有 2 条条带大小与正常组相同,分别是 1 000 bp 左右 1 条,200–400 bp 有 1 条,无与模型组相同大小的条带,有 3 条条带大小与铁皮石斛传统汤剂组相同,分别是 400–700 bp 有 1 条、200–400 bp 有 2 条。脾虚便秘造模影响小鼠肠道微生物,造成肠道乳酸杆菌失调,经铁皮石斛传统汤剂和超微 50%量汤剂治疗,得到调整,且铁皮石斛超微 50%量汤剂组最接近正常组水平。

2.3 各组小鼠肠道乳酸杆菌多样性指数及相似系数结果

多样性指数 Shannon 和 Brillouin 愈大,群落所含的信息量愈大,群落中生物种类增多,代表了群落的复杂程度增高。相似性系数 Czekanowski 越大,表示群落多样性越相似。经 DPS v7.05、NTSYS-PC 软件分析,各组小鼠肠道乳酸杆菌多样性指数和相

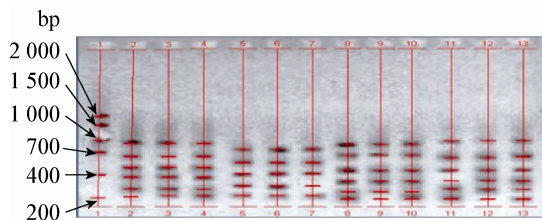


图 2 Quantity One 软件分析条带数量结果

Figure 2 The result analysed by Quantity One

注：2-4：正常组；5-7：模型组；8-10：铁皮石斛传统汤剂组；11-13：铁皮石斛超微 50%量组。

Note: 2-4: The normal group; 5-7: The model group; 8-10: Traditional decoction of *Dendrobium officinale* group; 11-13: 50% dose of ultra-micro powder of *Dendrobium officinale* group.

似系数如表 2 所示，正常组、铁皮石斛传统汤剂组和铁皮石斛超微 50%量汤剂组 Shannon 指数和 Brillouin 指数均相同，且大于模型组，则脾虚便秘造模使得小鼠肠道乳酸杆菌的多样性降低，经铁皮石斛治疗后其多样性有所恢复。比较各组肠道乳酸杆菌群落与正常组的相似性，铁皮石斛超微 50%量汤剂组的相似系数最大，为 0.333 3，模型组次之，传统汤剂组最小，为 0.166 7，则铁皮石斛超微 50%量汤剂组小鼠肠道细菌群落与正常组最相似，其对脾虚便秘的治疗效果较传统汤药组好。

表 1 各组小鼠肠道乳酸杆菌 ARDRA 的 OTUs 数				
Table 1 The OTUs by ARDRA of intestinal <i>Lactobacillus</i> in mice				
	正常组 The normal group	模型组 The model group	传统铁皮石斛汤剂组 The traditional decoction of <i>Dendrobium officinale</i> group	50%超微铁皮石斛汤剂组 The 50% dose of ultra-micro powder of <i>Dendrobium officinale</i> group
OTUs	6	5	6	6

表 2 各组小鼠肠道乳酸杆菌菌群多样性指数和相似系数			
Table 2 The diversity index and similarity coefficient of intestinal <i>Lactobacillus</i> in mice			
组别 Groups	Shannon ( <i>H'</i> )	Brillouin ( <i>H</i> )	Czekanowski ( <i>C<sub>s</sub></i> )
The normal group	2.585 0	1.582 0	1.000 0
The model group	2.321 9	1.381 4	0.181 8
The traditional decoction of <i>Dendrobium officinale</i> group	2.585 0	1.582 0	0.166 7
The 50% dose of ultra-micro powder of <i>Dendrobium officinale</i> group	2.585 0	1.582 0	0.333 3

2.4 各组小鼠肠道乳酸杆菌聚类分析和主成分分析

如图 3 所示，各组小鼠肠道乳酸杆菌菌群聚类分析如图 3 中 A，被聚为同一类的各组小鼠肠道乳酸杆菌群落结构和数量最接近。当聚类距离>20 且≤25 时，各组小鼠肠道乳酸杆菌菌群被聚为 2 类，正常组和两个治疗组聚为 1 类，模型组为 1 类；当聚类距离>15 且≤20 时，各组小鼠肠道乳酸杆菌菌群被聚为 3 类，正常组和模型组分别聚为 1 类，两个治疗组为 1 类；当聚类距离≤15 时，各组小鼠肠道乳酸杆菌菌群被聚为 4 类，每组为一类。脾虚便秘造模使得小鼠

肠道乳酸杆菌多样性发生改变，经铁皮石斛治疗，菌群结构得到一定的调整，且两种汤剂的治疗效果较一致，都接近正常组水平。各组小鼠肠道乳酸杆菌菌群主成分分析如图 3 中 B，四组对成分 1 的方差贡献率为 46.22%，对成分 2 的方差贡献率为 36.83%。铁皮石斛超微 50%量汤剂组位于第一象限，正常组位于第二象限，模型组位于第三象限，铁皮石斛传统汤剂组位于第四象限，且仅正常组对 PC2 的贡献率比较大，其余 3 组均对 PC1 的贡献率较大，则铁皮石斛传统汤剂和超微 50%量汤剂对脾虚便秘小鼠肠道乳酸杆菌群落结构和数量具有明显的调整作用，但并未达到正常组水平。



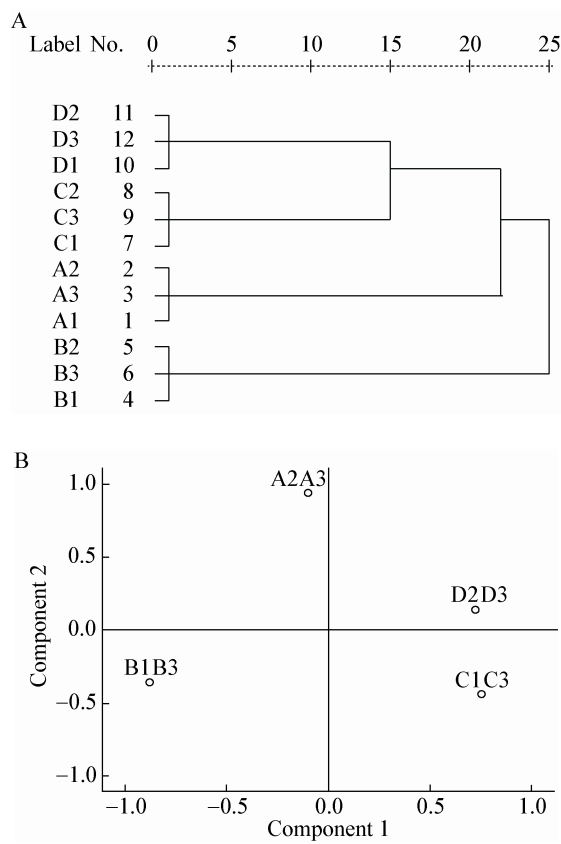


图 3 各组小鼠肠道乳酸杆菌聚类分析和主成分分析  
Figure 3 The cluster analysis and principal components analysis of intestinal *Lactobacillus* in mice  
注：A：聚类分析图；B：为主成分分析图。  
Note: A: The cluster analysis; B: The principal components analysis.

3 讨论

小鼠肠道菌群宏基因组经乳酸杆菌特异引物进行 PCR 扩增,产物经酶切后应用 ARDRA 技术进行统计分析,正常组、铁皮石斛传统汤剂组和微超 50%量汤剂组的 OTUs、Shannon 指数和 Brillouin 指数分别相同,且均大于模型组。铁皮石斛超微 50%量汤剂组与正常组群落结构的相似性系数最大,达到了 0.333 3,其次是模型组为 0.181 8,传统汤剂组则最小,为 0.166 7;小鼠肠道乳酸杆菌群落多样性因脾虚便秘造模而遭到破坏,经铁皮石斛两种汤剂治疗,有所调整,超微 50%量汤剂效果优于传统汤剂。聚类分析和主成分分析也显示类似结果。

乳酸杆菌是人体和动物胃肠道的益生菌群,经与病原菌对限制性营养素的竞争来抑制病原菌的生长,调节肠道微生态的组成,形成生物学屏障;其代谢所产生的乳酸、细菌素、过氧化氢以及双乙酰等物质对其他细菌的作用,有助于调整菌群之间的关系,使得菌群最佳优势组合得以维持和保证;通过与致病菌的拮抗作用,抑制其生长及毒素的粘附,阻止其侵入和定殖<sup>[21-22]</sup>。乳酸菌产生的酸性代谢产物使肠道环境偏酸性,符合一般消化酶的最适 pH 值要求,使得肠道的蠕动和分泌增强,同时也促进养分的消化吸收<sup>[23]</sup>。乳酸杆菌能促进重要维生素的生成,如人体内主要的 B 族维生素、叶酸,能减少同型半胱氨酸的产生,对抵抗慢性便秘等疾病有重要作用,而叶酸就是由乳酸乳球菌和植物乳酸杆菌合成的,同时又被加式乳酸杆菌所消耗,如此形成一个网络循环<sup>[24]</sup>。经证实,乳酸杆菌均具有润肠通便的作用,并对维持肠道菌群平衡有较好功效<sup>[12-13]</sup>,与本研究结果具有一致性。此外,乳酸杆菌还能产生植酸酶,能将不可溶性的营养成分水解为可溶性,加速肠道对营养素的吸收<sup>[25]</sup>,有利于对铁皮石斛有效成分的利用。乳酸杆菌在超微铁皮石斛对脾虚便秘的治疗中起着重要作用。

铁皮石斛化学成分复杂,富含石斛多糖、氨基酸、石斛碱、黏液质、微量元素等,对治疗胃肠道疾病等有很好的疗效<sup>[26-27]</sup>。铁皮石斛多糖能有效抑制肠道中的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌<sup>[28-29]</sup>,使得乳酸杆菌和双歧杆菌等有益菌得到竞争性增殖。体外研究发现石斛多糖对超氧阴离子自由基和羟基自由基有清除作用<sup>[30]</sup>,则铁皮石斛可能对与超氧阴离子自由基、羟基自由基相关的肠道微生物,如大肠杆菌等,起到促进或抑制作用。氨基酸、生物碱等为乳酸杆菌的生长提供丰富的氮源,还可在动物肠道中合成蛋白质及维生素。铁皮石斛中含有丰富的黏液质,可促进胃液的分泌,帮助消化,可能有助于肠道受损细胞的修复,促进乳酸杆菌的定植。铁皮石斛中含有丰富的微量元素,可为乳酸杆菌提供必需的营养物质。铁皮石斛能有

效改善脾虚便秘,其复杂的化学成分,对肠道乳酸杆菌的多样性调控作用明显。

## 参 考 文 献

- [1] Fernández-Bañares F. Nutritional care of the patient with constipation[J]. Nutritional and Dietary Consequences of Gastrointestinal Diseases, 2006, 20(3): 575-587.
- [2] 郭晓峰,柯美云,潘国宗,等. 北京地区成人慢性便秘整群、分层、随机流行病学调查及其相关因素分析[J]. 中华消化杂志, 2002, 22(10): 637-638.
- [3] 张虹玺. 养荣润肠舒合剂对慢传输型便秘的治疗作用及机理研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学博士学位论文, 2009.
- [4] 周景欣,袁杰利,迟俐,等. 双歧杆菌低聚果糖制剂对便秘人群肠道菌群的调整作用[J]. 中国微生态学杂志, 2006, 18(5): 399-400.
- [5] 明·李时珍. 本草纲目(上册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 1383-1384.
- [6] 王立明,徐建华,陈立钻,等. 铁皮枫斗晶对实验性胃阴虚证的药效学研究[J]. 中成药, 2002, 10(24): 803-805.
- [7] Ness RB, Kip KE, Hillier SL, et al. A cluster analysis of bacterial vaginosis-associated microflora and pelvic inflammatory disease[J]. American Journal of Epidemiology, 2005, 10(2): 585-590.
- [8] 刘墨,王长文,周海柱,等. 乳酸杆菌的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2010, 31(4): 236-238.
- [9] Baarlen P, Troost FJ, Hemert S, et al. Differential NF- $\kappa$ B pathways induction by *Lactobacillus plantarum* in the duodenum of healthy humans correlating with immune tolerance[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, 106(7): 2371-2376.
- [10] Nermes M, Kantele JM, Atosuo TJ, et al. Interaction of orally administered *Lactobacillus rhamnosus* GG with skin and gut microbiota and humoral immunity in infants with atopic dermatitis[J]. Clinical & Experimental Allergy, 2010(41): 370-377.
- [11] Partty A, Kalliomaki M, Endo A, et al. Compositional development of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* microbiota is linked with crying and fussing in early infancy[J]. PLoS One, 2012, 7: 1-4.
- [12] 彭芝榕,刘晓梅,倪学勤,等. 植物乳杆菌 F1208对便秘大鼠胃肠道功能的影响[J]. 食品科学, 2013, 34(13): 243-246.
- [13] 刘晓梅,彭芝榕,倪学勤,等. 低聚果糖、乳酸杆菌对便秘模型大鼠的通便功能影响[J]. 食品科学, 2013, 34(11): 296-299.
- [14] Zheng F, Meiying FU, Zhao Z, et al. Community diversity of associated bacteria of *radopholus similis*[J]. Plant Diseases and Pests, 2012, 3(2): 33-37.
- [15] Gao F, Yi Z, Gong J, et al. Molecular phylogeny and species separation of five morphologically similar *Holosticha*-complex ciliates (Protozoa, Ciliophora) using ARDRA ribotyping and multigene sequence data[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2010, 28(3): 542-548.
- [16] 邹颖,郑学宝,戴世学,等. 小鼠脾虚便秘模型的建立[J]. 北京中医药, 2009, 28(1): 60-62.
- [17] 张思璐,刘云霄,张浩琪,等. 属特异性 T-RFLP 技术用于乳酸杆菌的群落分析[J]. 微生物学通报, 2012, 39(8): 1179-1189.
- [18] 吴海. 超微七味白术散对肠道微生物分子多样性的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学硕士学位论文, 2012.
- [19] 吴海,周赛男,郭纯,等. 一种基于 PCR 分析多样性的小鼠肠道微生物宏基因组提取方法[J]. 中国微生态学杂志, 2012, 24(7): 648-651.
- [20] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [21] Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease[J]. Gastroenterology, 2009, 136(1): 65-80.
- [22] Macfarlane S, Dillon JE. Microbial biofilms in the human gastrointestinal[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 102(5): 1187-1196.
- [23] 张力,郑中朝. 饲料添加剂手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [24] Bengmark S. Synbiotics in human medicine[A]//James V, Michael W. Therapeutic Microbiology: Probiotics and Related Strategies[M]. Washington DC: ASM Press, 2008: 307-321.
- [25] Famularo G, De Simone C, Pandey V, et al. Probiotic lactobacilli an innovative tool to correct the malabsorption syndrome of vegetarians[J]. Medical Hypotheses, 2005, 65(6): 1132-1135.
- [26] 魏小勇. 石斛属植物生物碱研究进展[J]. 中国药事, 2005, 19(7): 445-447.
- [27] 李玲,邓晓兰,赵兴兵,等. 铁皮石斛化学成分及药理作用研究进展[J]. 肿瘤药学, 2011, 1(2): 90-93.
- [28] 李蕾,丁长春,李付惠. 两种石斛多糖的抑菌作用研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(10): 5753-5754.
- [29] 张周英,杨成密,蓝忠,等. 石斛多糖的抗菌作用研究[J]. 中国医药指南, 2012, 10(33): 439-440.
- [30] 查学强,王军辉,潘利华,等. 石斛多糖体外抗氧化活性的研究[J]. 食品科学, 2007, 10(28): 92-93.