

乌龙茶水提物对小鼠肠道菌群免疫功能的影响

朱金智 吴国楠 赵晨斐 毕芳芳

西安培华学院, 中国·陕西 西安 710125

【摘要】目的: 探讨乌龙茶水提物对小鼠肠道菌群免疫功能的影响。方法: 用盐酸林可霉素制备小鼠肠道菌群失调模型, 然后应用乌龙茶水提物进行治疗, 治疗后进行肠道菌群分析, 并通过ELISA法检测肠粘膜 sIgA、肠组织 IL-2 的含量。结果: 小鼠肠道菌群失调, 肠粘膜 sIgA、肠组织 IL-2 含量均较模型组低。乌龙茶水提物治疗后, 肠道菌群菌量明显恢复, 肠粘膜 sIgA 及肠组织 IL-2 的含量显著升高。结论: 乌龙茶水提物确实具有控制和改善小鼠腹泻症状, 影响肠道正常菌群生长的作用。

【关键词】乌龙茶水提物; 菌群失调; 免疫功能; sIgA; IL-2

【基金项目】2021 年西安培华学院大学生创新创业训练计划项目“乌龙茶水提物对小鼠肠道菌群免疫功能调节作用的研究”(PHDC2021069)。

肠道是人体最大的消化器官, 完整的肠黏膜屏障能够阻止微生物及内毒素进入体循环, 维持肠道正常功能, 保证机体健康^[1]。肠黏膜屏障功能一旦受损, 肠道通透性升高, 肠腔内毒素突破肠道屏障进入机体循环, 促使大量的炎症细胞因子释放, 引起机体炎症, 进而诱发异常的黏膜免疫反应^[2]。近年来研究发现肠黏膜屏障损伤与肠道炎症、机体免疫、肥胖、胰岛素抵抗及糖尿病等多种疾病相关^[3-4]。因此, 维持肠黏膜屏障功能的完整性将为临床疾病干预提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物

雄性4-6周的C57BL/6小鼠48只, 由西安交通大学实验动物中心提供, 体重20~25g, 雌雄各半, 随机分成6组, 每组8只。除设置正常对照组外, 其它5组均用盐酸林可霉素造成菌群失调性腹泻后, 分别为模型组、自然恢复组、实验高剂量组(乌龙茶水提物治疗组)、实验低剂量组(乌龙茶水提物治疗组)。

1.1.2 药物及试剂

乌龙茶水提物采用热提取方式获得。乌龙茶由福建雅之道茶业公司提供。

1.1.3 培养基

为分离肠道菌群的选择性培养基: TPY (双歧杆菌选择性培养基)、MRS (乳酸杆菌选择性培养基)、EC (肠球菌选择性培养基)、SS (肠杆菌选择性培养基)。

1.2 方法

1.2.1 给药

除正常对照组灌以等量的生理盐水, 其它各组均以盐酸林可霉素灌胃, 剂量 5000 mg/(kg·d), 连续 3 d 达到抗生素脱污染菌群失调的程度。造成模型后第 4 天灌胃乌龙茶水提取物, 剂量为 0.5 ml/d (低剂量)、1.0 ml/d (高剂量), 每组持续给药 7d。

1.2.2 肠道菌群检查

1.2.2.1 标本采取

将小鼠断颈处死后, 解剖小鼠取盲肠内容物称重, 加入生理盐水, 连续 10 倍稀释至 10⁻⁸ 稀释度。

1.2.2.2 接种: 取上述各稀释液 20 μl 滴加到 TPY、MRS、EC 和 SS 琼脂平板上。

1.2.2.3 细菌培养和计数: 将 TPY 置 37℃ 厌氧培养 48~72h; EC、SS、MRS 和普通营养琼脂置 37℃ 普通培养 24~48h, 根据菌落菌形特征计数。

1.2.3 小肠黏液 sIgA 的测定

取靠近回肠部 1.5 cm 的肠段, 铺于滤纸上, 纵向剖开, 用生理盐水冲洗肠腔表面, 再用载玻片刮取黏膜表面黏液至离心管, 加入 0.01mol/L PBS 0.5ml 充分混匀, 8000rpm 离心 15min 取上清。-20℃ 保存。采用 ELISA 法, 按试剂盒说明书进行检测。

1.2.4 血清中 IL-2 的测定

取小肠组织匀浆 (100mg 组织+0.5ml PBS), 4℃ 8000 rpm 离心 30 min 取上清, 采用 ELISA 法, 按试剂盒说明书进行检测。

2 结果

2.1 各组小鼠粪便标本菌群检测。从表 1 可看出, 与正常对照组比, 肠道正常菌群菌量均发生显著降低, 表明肠道菌群失调模型已经建立。乌龙茶水提物治疗后, 肠道菌群菌量明显恢复, 表明乌龙茶水提物可以有效逆转菌群失调。

2.2 各组小鼠肠粘膜 sIgA 含量检测。如表 2 所示, 小鼠肠道菌群失调后, 肠粘膜 sIgA 的含量显著下降。乌龙茶水提物能提高失调小鼠肠粘膜 sIgA 的含量。

2.3 各组小鼠肠组织 IL-2 表达检测。如表 2 所示, 小鼠肠道菌群失调后, 肠组织 IL-2 含量显著降低。乌龙茶水提物能提高失调小鼠肠组织 IL-2 的表达。

表 1 各组小鼠粪便标本菌群检测结果比较 ($\bar{X} \pm S, Lg^{10}/n/g$)

组别	双歧杆菌	乳酸杆菌	肠杆菌	肠球菌
正常对照组	9.37±0.39	9.53±0.13	8.32±0.15	7.26±0.11
模型组	8.14±0.14 [*]	8.04±0.53 [*]	6.38±0.27 [*]	6.26±0.10 [*]
自然恢复组	8.74±0.29	8.52±0.46	6.74±0.53	6.53±0.27
高低量治疗组	9.22±0.53 [#]	9.46±0.85 [#]	8.27±0.19 [#]	7.08±0.16 [#]
低剂量治疗组	9.16±0.42 [#]	9.32±0.41 [#]	8.08±0.41 [#]	7.01±0.24 [#]

与正常对照组比较 * $p < 0.05$; 与模型组比较 # $p < 0.05$

表2 肠粘膜 sIgA 含量及 IL-2 检测结果 ($\bar{X} \pm S$)

组别	sIgA (ng/ml)	IL-2 (pg/ml)
正常对照组	21.57 $\pm$ 2.18	201.02 $\pm$ 11.12
模型组	15.74 $\pm$ 1.74*	151.67 $\pm$ 9.48*
自然恢复组	16.96 $\pm$ 2.35	162.73 $\pm$ 10.96
高低量治疗组	20.01 $\pm$ 3.37#	198.53 $\pm$ 12.43#
低剂量治疗组	18.17 $\pm$ 1.96#	187.83 $\pm$ 11.64#

与正常对照组比较 * $p < 0.05$; 与模型组比较 # $p < 0.05$

3 讨论

本实验用大剂量盐酸林可霉素制造小鼠肠道菌群失调性腹泻模型,再用乌龙茶水提物对小鼠进行治疗,结果表明乌龙茶水提物确实具有控制和改善小鼠腹泻症状,影响肠道正常菌群生长的作用。

在正常人体内,肠道菌群处于动态平衡状态,人体生病或接受抗生素治疗时,肠道菌群的组成和数量发生变化[5-6]。肠道菌群失调可致人体许多疾病,保持肠道微生态平衡是维持人体健康所必需的。其中由滥用抗生素而引起的弊端已经引起了医学界的普遍关注。抗生素能破坏正常微生物的组成,导致肠道菌群失调,使肠道菌群成了细菌耐药性产生和传播的疫源地。

乌龙茶作为一种特殊的黑茶,近年来逐渐成为消费者追逐的对象。乌龙茶具有很多保健功能[7],有研究明确表明乌龙茶有很好的降脂减肥功效,乌龙茶提取物具有治疗腹泻的作用。茶叶中的功能性成分如茶多糖、茶氨酸和茶多酚等已被证实在调节免疫方面有重要作用[8-10]。乌龙茶中的茶多糖、茶多酚含量较高,这些活性成分具有增强免疫功能的功效。目前已有许多关于乌龙茶降脂减肥,及抗肿瘤等方面特殊作用的报道,而对免疫方面的影响极少报道,因此本文探讨乌龙茶对肠道菌群调节作用,为乌龙茶在调节小鼠肠道免疫功能的应用上提供了一些依据,为进一步研究乌龙茶对肠道的健康作用机理提供了参考。

参考文献:

- [1] 黄蓉,欧希龙. 肠道黏膜屏障功能损伤机制及其防治的研究进展[J]. 现代医学, 2015, 43(5): 659-662.
- [2] MERGA Y, CAMPBELL B J, RHODES J M. Mucosal barrier, bacteria and inflammatory bowel disease: possibilities for therapy[J]. Digestive Diseases, 2014, 32(4): 475-483.
- [3] GIUFFRIDA P, BIANCHERI P, MACDONAID T T. Pro-teases and small intestinal barrier function in health and disease[J]. Current Opinion in Gastroenterology, 2014, 30(2): 147-153.
- [4] SCALDAFERRI F, PIZZOFERRATO M, GERARDI V, et al. The gut barrier: New acquisitions and therapeutic approaches[J]. Journal of Clinical Gastroenterology, 2012, 46: S12-17.
- [5] YAMASHITA T, EMOTO T, SASAKI N, et al. Gut Microbiota and coronary artery disease [J]. Int Heart J, 2016, 57(6): 663-671.
- [6] KLEINE M, WORBS T, SCHREM H, et al. Helicobacter he-paticus induces an inflammatory response in primary human he-patocytes [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e99713-99723.
- [7] 刘勤晋,司辉清,钟麒麟. 黑茶营养保健作用的研究[J]. 中国茶叶, 1994, 16(6): 36-37.
- [8] 杨敏,赵文华,王书奉等. 粗老茶中的茶多糖对免疫功能的影响[J]. 时珍国药研究, 1997, 8(4): 22-23.
- [9] 沈健,陈增良,鲍建芳等. 茶多糖对实验性免疫力低下小鼠免疫功能的影响[J]. 浙江预防医学, 2007, 19(4): 96-97.
- [10] 陈宗懋. 茶的杀菌和抗病毒功效[J]. 中国茶叶, 2009, 31(9): 4-5.