

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.01.008

槟榔籽多酚对肠道微生物体外发酵的影响

Effects of polyphenols from Areca seed on intestinal microbes in vitro

成 焕¹王远亮^{1,2}CHENG Huan¹ WANG Yuan-liang^{1,2}

(1. 湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南 长沙 410128;

2. 食品科学与生物技术湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128)

(1. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China;

2. Hunan Key Laboratory of Food Science and Technology, Changsha, Hunan 410128, China)

摘要:通过间歇式静态厌氧体外发酵技术研究鲜槟榔籽中多酚类物质对青年健康男性肠道微生物的影响。采集 24 岁健康男性的粪便为菌源,分别以对照组(C 组)、添加了纯度为 74.09% 的槟榔籽多酚的试验组(P 组)为底物分别进行 2, 6, 12, 24 h 4 个时间段的体外发酵。利用气相色谱、高通量测序等方法对 pH 值、多酚成分、短链脂肪酸(SCFAs)和微生物指标进行测定。结果显示,槟榔籽多酚对青年健康男性肠道微环境中 pH 变化趋势影响不大,但会降低 SCFAs 的产量。肠道菌群方面,可以提高其肠道菌群的物种多样性水平,改变变形菌门(*Proteobacteria*)与厚壁菌门(*Firmicutes*)相对丰度比值,其中柔嫩梭菌属(*Faecalibacterium*)增加幅度最大,拟杆菌属(*Bacteroides*)和双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)的相对丰度也有小幅增加。研究表明槟榔籽多酚能改变肠道菌群结构,但暂未发现与其他植物多酚类似的功效。

关键词:槟榔籽;多酚;肠道菌群;短链脂肪酸;静态厌氧培养;高通量测序

Abstract: This study aimed to investigating the effects of the polyphenols from Areca seeds on young men's intestinal microbes in vitro through intermittent static anaerobic fermentation technology. The feces of 24 years healthy young men are taken as starter. The substrates of the control group (group C) and the experimental group (group P) with a purity of 74.09% were fermented in vitro at 2, 6, 12 and 24 h. pH value, polyphenol composition, short chain fatty acid (SCFAs) and microorganism index were measured by gas chromatography and high-throughput sequencing. The results showed that the polyphenols of the Areca-nut polyphenols had little effect on the change of pH in the intestinal microenvironment of young healthy men, but it reduced the content of SCFAs. In terms of intestinal flora, it could improve the species diversity level of its intestinal flora, reduce the relative abundance of *Proteobacteria*, and improve the relative abundance of *Firmicutes*. Among them, the largest increase is *Faecalibacterium*, while the relative abundance of *Bacteroides* and *Bifidobacterium* was also slightly increased. The above results showed that betel nut polyphenols could change the structure of intestinal flora, but no similar health effects was found.

Keywords: Areca seed polyphenols; Intestinal flora; short chain fatty acids (SCFAs); static anaerobic culture; High-throughput sequencing

Keywords: Areca seed polyphenols; Intestinal flora; short chain fatty acids (SCFAs); static anaerobic culture; High-throughput sequencing

槟榔是一种药食同源的植物,在西汉年间传入中国,有上百年的药用历史,与益智仁、砂仁、巴戟天并称为中国四大南药,主要成分为槟榔碱、多酚、脂肪、氨基酸、槟榔红色素等^[1]。但近 20 多年来对槟榔的争议越来越大,尤其是 2003 年被认定为一级致癌物后,槟榔被推到了风口浪尖,现阶段研究中明晰的主要是槟榔碱的生理功效,对其他成分的研究报道相对较少^[2-3]。另外人体中微生物的数量占人体总细胞数量的 90% 左右,其中肠道菌群数量最多,对人体的影响最为明显^[4]。这些数量庞大的肠道菌群大致可以分为有益菌、中性菌及有害菌三类,它们通过一定的比例进行组合,相互制约,相互依存^[5]。人体肠道菌群还能编码超过 330 万个基因,并在人体营养物质代谢、自身发育、免疫及疾病等方面发挥作用^[6],外肠道微生物已成为人们研究膳食因子营养功效机制普遍采用的载体。Rycroft 等^[7]采用肠道菌群体外发酵模式对益生菌寡糖的性质进行评价,与肠道内发酵的结果相

基金项目:海南省重大科技计划项目(编号:ZDKJ2016003);海南省应用技术研发与示范推广专项(编号:ZDXM2015013);湖南省湘潭市重点项目(编号:NY-ZD20161002);湘潭市科技特派员项目(编号:CXY-TPZJ20171020)

作者简介:成焕,女,湖南农业大学在读硕士研究生。

通信作者:王远亮(1971—),男,湖南农业大学教授,博士。

E-mail: wangyuanliang@hunau.edu.cn

收稿日期:2018-09-23

比,两者在细菌丰度、组成和代谢产物等方面都相似。

本试验拟以肠道微生物为载体,采用间歇式静态厌氧体外发酵技术,探究槟榔籽多酚对肠道菌群的作用效果。将健康青年男性粪便作为体外发酵菌源,以对照组(C组)、添加了纯度为 74.09% 的槟榔籽多酚的试验组(P组)分别在体外发酵 2, 6, 12, 24 h, 分析多酚物质的成分变化, 发酵环境的 pH 值, 肠道微生物多样性、菌群相对组成和生态关系等。旨在为探讨鲜槟榔籽中多酚物质调控肠道微生物提供基础研究, 为槟榔药用研究提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

槟榔籽多酚:通过有机溶剂提取和大孔树脂分离,以没食子酸为标品测得纯度为 74.09% 的多酚提取粉末;

粪便样品:选择年龄均在 24 岁且饮食习惯相近的健康男性 3 名,要求志愿者 2 个月内未服用抗生素,且无肠道病史,于早饭前采集 3 名志愿者的粪便样品;

没食子酸(GA)标准品:纯度 $\geq 98.5\%$,上海瑞永生生物科技有限公司;

表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、表没食子儿茶素(EGC)、表儿茶素没食子酸酯(ECG)、表儿茶素(EC)、儿茶素(DL-C)、没食子儿茶素没食子酸酯(GCG):标准品,美国 Sigma 公司;

短链脂肪酸标准溶液:乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸和异戊酸,美国 Sigma 公司;

试验用水均为超纯水。

1.2 仪器与设备

紫外—可见分光光度计:WFJ7200 型,北京莱伯泰科仪器有限公司;

厌氧操作台:YQX-II 型,上海跃进医疗器械厂;

厌氧培养箱:BASICI 型,重庆江雪科技有限公司

高效液相色谱仪:1200 型,安捷伦科技有限公司;

气相色谱仪:7890A 型,安捷伦科技有限公司;

PCR 热循环仪:GeneAmp[®] PCR System 9700 系列,美国爱普拜斯公司;

台式冷冻离心机:TGL20 型,长沙英泰仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 粪便处理 收集志愿者新鲜全便,各称取 4 g 加入 36 mL 经脱氧处理的磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)进行混合,旋涡振荡 3 min,配成粪便悬液,用纱布过滤,备用。

1.3.2 槟榔籽多酚体外发酵 参考并改进吴根梁等^[8]体外发酵的方法,研究槟榔籽多酚对人体肠道微生物的影响。37 °C 条件下,模拟人体肠道厌氧环境,在发酵液中加入菌源进行静态培养,监测各发酵阶段(2, 6, 12, 24 h)

短链脂肪酸、pH 值和微生物指标的变化。

基础发酵液 1 L 配方(pH 值 7.0):蛋白胨 2 g, 酵母提取粉 2 g, NaCl 0.1 g, K₂HPO₄ 0.04 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.01 g, CaCl₂ · 2H₂O 0.01 g, NaHCO₃ 2 g, 氯化血红素 0.05 g, L-半胱氨酸 0.5 g, 猪胆汁酸盐 0.5 g, Tween-80 2 mL, 维生素 K₁ 10 μL。将多酚提取粉末溶于培养基中,添加 10% 的菌悬液,此时多酚浓度为 1 g/100 mL, 摇匀后置于 37 °C 厌氧培养箱发酵,所有试验进行 3 次重复。

1.3.3 主要儿茶素单体含量测定 高效液相色谱检测条件:规格为 4.6 mm × 250 mm × 5 μm 的 Calesil-C18 液相色谱柱;柱温为 35 °C;检测波长为 278 nm;进样量为 10 μL;流速为 1.0 mL/min。试验采用梯度洗脱,流动相 A 为超纯水,流动相 B 为体积比为 40 : 2 : 1.5 的 N,N-2 甲基甲酰胺:甲醇:冰醋酸的混合液,洗脱时间及流动相变化情况为:0.01 min, 80% A + 20% B; 15 min, 72% A + 28% B; 28 min, 60% A + 40% B; 32 min, 60% A + 40% B; 35 min, 80% A + 20% B; 40 min, 80% A + 20% B。用外标法计算各种成分的含量

1.3.4 pH 值的测定 用 pH 计直接测定。

1.3.5 短链脂肪酸的含量测定 参考耿梅梅等^[9]的方法,用 DB-FFAP 气相色谱柱(60 m × 0.25 mm × 0.25 μm),流速 0.8 mL/min;进样量 1 μL,分流比 50 : 1,程序升温:初始温度 60 °C,维持 2 min,以 20 °C/min 升至 220 °C,保持 3.5 min;氢火焰离子化检测器,温度 250 °C,

1.3.6 Ion S5 XL 平台扩增子测序分析

(1) 样本 DNA 提取及 PCR 扩增:采用 SDS 方法提取样本的基因组 DNA,然后用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓度。以检测达标的基因组 DNA 为模板,对样品的 16S rDNA V3 + V4 区域进行扩增:341F(5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3'), 806R (5'-GGACTACH-VGGGTWTCTAAT-3'),使用带 Barcode 的特异引物扩增得到相应的产物

(2) PCR 产物的混样和纯化:根据 PCR 产物浓度进行等质量混样,待充分混匀后用 1 × TAE 浓度 2% 的琼脂糖胶电泳纯化,剪切回收目标条带。

(3) 文库构建与测序:文库构建使用美国 Thermofisher 公司的 Ion Plus Fragment Library Kit 48 rxns 建库试剂盒,然后用 Qubit 定量仪进行定量和文库合格检测,最后用 Thermofisher 公司的 IonS5[™] XL 测序仪进行测序。

1.4 数据分析

1.4.1 理化指标数据分析 试验均进行 3 次独立样品的测定,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。运用 SPSS 25.0 软件的单因素分析方法(ANOVA)进行显著性分析,当 P < 0.05 表示差异显著。数据图通过 Excel 2010 软件完成。

1.4.2 Ion S5 XL 平台扩增子测序数据分析 对单端测

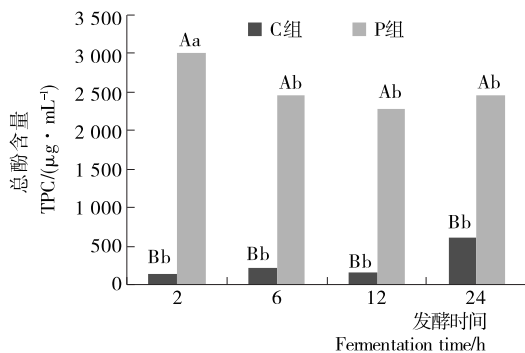
序得到的原始數據進行質控、過濾、去嵌合體, 得到有效數據^[10], 然後利用 Uparse 軟件對序列進行聚類和物種注釋^[11], 運用 Qiime^[12] 和 Usearch^[13] 軟件進行樣品複雜度分析, 運用 R^[13] 軟件進行統計和作圖。

2 結果與分析

2.1 檳榔籽多酚利用情況

由圖 1 可以看出, 2 組中的多酚含量具有顯著差異, 變化趨勢也不相同, C 組中多酚含量為上升趨勢, 在 24 h 時達到最高, 與 2 h 相比增加了 477.07 $\mu\text{g}/\text{mL}$; P 組則為下降趨勢, 2~6 h 為多酚的主要利用階段, 期間減少 549.47 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 利用率為 18.26%。組間對比可知, 不同時間段 P 組中多酚含量均比 C 組高出 1 個數量級以上。由數據分析可知, 2 組的多酚含量具有顯著性差異, 在酚類物質充足的條件下, 腸道微生物會在前期就利用酚類物質; 在酚類物質缺乏的條件下, 腸道微生物可利用環境中的營養物質轉化生成酚類物質。

試驗還測定了生理功能比較豐富的一類酚類物質——兒茶素類。在本樣品中兒茶素類佔總酚含量的



不同小寫字母表示不同時間點同組內 Duncan 檢驗差異顯著, $P < 0.05$; 不同大寫字母表示同一時間點不同組中 Duncan 檢驗差異顯著, $P < 0.05$

圖 1 檳榔籽多酚的含量變化

Figure 1 Changes of the content of areca polyphenols

10% 左右。由表 1 可知, 在 6 h 時 C 組檢測到少量的各類主要的兒茶素, 說明腸道微生物在體外可將非其他物質轉化成小分子酚類物質, 供自身利用, 但在 12 h 時卻無法檢出, 可知 GA、EGC、DL-C、EC 和 EGCG 被全部利用。P 組中兒茶素的總體變化趨勢是先增多後減少, 24 h 發酵液中多酚濃度較 2 h 增加了 84 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 與 C 組一致。比較單體的變化趨勢可發現, GA 和 EGC 的變化趨勢相似, DL-C、EC 和 EGCG 的變化趨勢相似; 且前兩者均在 6 h 陡增, 後三者含量在 6 h 處大幅減少, 推測腸道微生物中的一種或多種菌在它們的相互轉化過程中起到了關鍵作用, 與 Schantz 等^[14] 研究的綠茶中的 EGCG 在小腸中可分解為 GA 和 EGC 的結果相符。分析圖 1 可知, 在酚類物質充足的條件下, 腸道微生物會在前期利用酚類物質, 本試驗中檳榔籽多酚添加量為 10 mg/mL 時, 培養 6 h 後的利用率為 18.26%, 茶多酚的吸收在小腸部位不受其質量濃度的影響^[15], 但在大腸處是否受其質量濃度的影響還有待研究。

2.2 發酵液中 pH 值的變化

C、P 組的起始 pH 值相近都在 9 左右, 但微生物的生長會影響 pH 值, 檢測發酵過程各階段各發酵液的 pH 值, 如圖 2 所示。

由圖 2 可知, 在 24 h 內 C、P 組的 pH 值均持續下降, 變化趨勢相似。在 2 h 時 2 組的 pH 差別最大, C 組比 P 組高 0.43; 2~6 h 時減幅最大, C 組由 9.17 下降到 7.78, P 組由 8.74 下降到 7.88; 12 h 時 2 組又回到同一水平; 繼續發酵到 24 h, pH 均小幅下降, C 組減幅大於 P 組。數據表明檳榔籽多酚可以使 pH 在短時間內快速降低, 但不影響 24 h 內的變化趨勢。

2.3 短鏈脂肪酸含量的變化

短鏈脂肪酸是人類腸道菌群的發酵產物, 即可以作為腸道黏膜細胞的主要能量來源, 還能減少促炎症因子的產生, 降低腸道炎症^[16]、癌症^[17] 的發生。如表 2 所示, 糞菌中微生物在 24h 的體外培養中, 2 組變化趨勢基本

表 1 檳榔籽多酚中兒茶素類物質的含量變化[†]

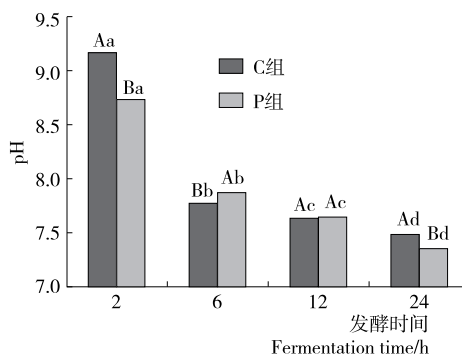
Table 1 Changes of the content of areca seed polyphenols and its main components

$\mu\text{g}/\text{mL}$

編號	GA	EGC	DL-C	EC	EGCG	GCG	兒茶素類
C2	0 ^a	0 ^b	0 ^{Bb}	0 ^{Bb}	0 ^{Bb}	1.04±0.10 ^a	1.04±0.10 ^{Bb}
C6	2.51±3.78 ^{Ba}	1.05±0.40 ^{Ba}	0.24±0.09 ^{Ba}	0.48±0.19 ^{Ba}	0.16±0.27 ^{Ba}	0.31±0.54 ^{Bb}	2.23±0.66 ^{Ba}
C12	0 ^a	0 ^b	0 ^{Bb}	0 ^{Bb}	0 ^{Bb}	1.10±0.49 ^{Ba}	1.10±0.49 ^{Bb}
C24	0 ^{Ba}	0 ^b	0 ^{Bb}	0 ^{Bb}	0 ^{Bb}	0.79±0.08 ^{Bab}	0.79±0.08 ^{Bb}
P2	0 ^b	0 ^b	224.23±24.27 ^{Ac}	19.45±0.28 ^{Ab}	5.31±0.83 ^{Aa}	2.15±1.60 ^b	251.14±26.28 ^{Ac}
P6	9.87±0.59 ^{Aa}	299.78±14.85 ^{Aa}	37.74±2.61 ^{Ad}	5.30±0.89 ^{Ac}	1.94±0.41 ^{Ab}	4.52±0.71 ^{Aa}	349.49±19.00 ^{Ab}
P12	0.14±0.24 ^b	0 ^b	331.54±9.00 ^{Aa}	37.44±1.28 ^{Aa}	5.70±0.17 ^{Aa}	5.74±0.30 ^{Aa}	380.41±10.57 ^{Aa}
P24	0.36±0.05 ^{Ab}	0 ^b	289.85±7.04 ^{Ab}	37.28±0.84 ^{Aa}	5.49±0.15 ^{Aa}	2.63±0.26 ^{Ab}	335.25±8.08 ^{Ab}

[†] 不同小寫字母表示不同時間點同組內 Duncan 檢驗差異顯著, $P < 0.05$; 不同大寫字母表示同一時間點不同組中 Duncan 檢驗差異顯著, $P < 0.05$; 數值為 0 表示未檢出。

一致,C组中的 SCFAs 含量显著高于 P 组。以上 6 种短链脂肪酸的产生情况如下:其中乙酸和丙酸基本为线性增长,丁酸和异戊酸含量的增加主要在 12~24 h,增量为乙酸>丙酸>丁酸>异戊酸。在培养 24 h 后,C 组中乙酸、丙酸、丁酸和异戊酸分别提高了 6.99,7.74,1.59,2.87 倍;P 组则分别提高 4.51,5.42,1.75,1.35 倍;C 组比 P 组明显提高了 1.19,1.25,0.91,2.33 倍。异丁酸在 C 组中呈小幅增加,P 组前 12 h 则呈小幅下降,12~24 h 时回升,但仍略低于起始量。戊酸在 2 组中变化均不明显。以上数据表明,棕榈籽多酚不影响 SCFAs 的变化趋势,但会减弱乙酸、丙酸、丁酸、异戊酸的增幅,抑制其在发酵过程中的积累。比较菌群和 SCFAs 变化趋势发现,*Parabacteroides* 和异戊酸含量变化趋势一致;*Bacteroides*、*Bilophila*与丁酸含量变化趋势相似,这些菌群和特定短



不同小写字母表示不同时间点同组内 Duncan 检验差异显著, P<0.05;不同大写字母表示同一时间点不同组中 Duncan 检验差异显著, P<0.05

图 2 各发酵时间段 pH 值变化图

Figure 2 pH values for each fermentation period

表 2 短链脂肪酸(SCFAs)的含量变化[†]

Table 2 Changes of the content of SCFAs

μg/mL

编号	乙酸	丙酸	异丁酸	丁酸	异戊酸	戊酸
C2	67.87±3.97 ^{Bd}	27.17±2.29 ^{Ad}	5.52±0.87 ^b	15.63±2.48 ^b	3.27±0.63 ^c	1.33±0.20 ^{ab}
C6	289.34±1.15 ^{Ac}	119.34±1.15 ^{Ac}	5.72±0.21 ^{ab}	16.80±0.17 ^{Ab}	3.84±0.33 ^{Ac}	1.76±0.39 ^a
C12	339.67±14.84 ^{Ab}	161.67±21.22 ^{Ab}	6.14±0.07 ^{ab}	17.83±0.57 ^{Ab}	4.70±0.03 ^{Ab}	1.12±0.14 ^b
C24	474.67±23.16 ^{Aa}	210.33±6.03 ^{Aa}	6.50±0.03 ^a	34.90±0.72 ^{Aa}	9.38±0.30 ^{Aa}	1.40±0.22 ^{ab}
P2	88.23±1.10 ^{Ad}	30.90±0.87 ^{Ad}	6.71±0.62 ^a	16.30±0.60 ^b	2.97±0.51 ^c	1.21±0.07 ^b
P6	217.33±6.69 ^{Bc}	103.33±4.16 ^{Bc}	5.96±0.42 ^{ab}	14.13±0.32 ^{Bc}	2.03±0.14 ^{Bc}	1.00±0.19 ^b
P12	286.33±4.69 ^{Bb}	115.00±6.93 ^{Bb}	5.60±0.33 ^b	14.57±0.25 ^{Bbc}	2.13±0.21 ^{Bb}	1.19±0.11 ^b
P24	398.33±20.53 ^{Ba}	167.33±5.13 ^{Ba}	6.45±0.40 ^{ab}	28.47±1.99 ^{Ba}	4.02±0.48 ^{Ba}	1.47±0.15 ^a

[†] 不同小写字母表示不同时间点同组内 Duncan 检验差异显著, P<0.05;不同大写字母表示同一时间点不同组中 Duncan 检验差异显著, P<0.05;数值为 0 表示未检出。

链脂肪酸的代谢是否有关,以及作用机制还需要进一步研究。

2.4 发酵过程中微生物多样性分析

膳食是影响肠道微生物生长的重要因素,棕榈籽多酚通过体外发酵会引起人体肠道微生物变化。

2.4.1 门水平上肠道菌群的结构变化 为了确定微生物的变化是否主要由棕榈籽多酚引起,对样品在门水平上进行聚类分析(Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Mean,UPGMA),如图 3 所示 C 组的 4 个时间点聚在一起,P 组的 4 个时间点也聚在一起,说明棕榈籽多酚的加入使 2 组产生了差异,并且组间差异大于组内差异。利用主成分分析进行验证,也得到了相同结果,可以得出后续微生物变化主要是由棕榈籽多酚加入引起的。

由图 3 中还可以看出,放线菌门(*Actinobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)是它们共同的优势微生物。以时间为序,厚壁菌门在 2 组内的变化趋势一致,菌群丰度先增加后减少,P 组变化幅度大于

C 组。

2.4.2 属水平上肠道菌群的结构变化 为找出属水平下各样本中的优势物种,选取丰度排名前 35 的属,根据其在每个样品中的丰度信息,从物种和样品两个层面进行聚类。如图 4 所示,这 35 个属的细菌分属于 6 个优势的细菌门:19 个厚壁菌门(*Firmicutes*)类细菌,8 个变形菌门(*Proteobacteria*)类细菌,3 个拟杆菌门(*Bacteroidetes*)类细菌,3 个放线菌门(*Actinobacteria*)类细菌,1 个拟杆菌门(*Fusobacteria*)类细菌,1 个疣微菌门(*Verrucomicrobia*)类细菌。聚类分析结果显示,体外培养试验中 C、P 组的优势菌存在明显差异。棕榈籽多酚使肠道菌群中 21 个菌属相对丰度变化明显。

选取在属水平上相丰度排名前 10 的微生物进行比较,Others 表示图中这 10 个属之外的其他所有属的相对丰度之和。如图 5 所示,P 组中柔嫩梭菌属(*Faecalibacterium*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)和 *Blautia* 高于 C 组,柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)和 *Parabacteroides* 的丰度显著低于 C 组。在 P 组中柔嫩梭菌属丰度由 0.72% 增加到

31.79%，柔嫩梭菌类群是一种人体肠道菌群的共生菌，其很多成员具有重要的生理功能，如降解膳食纤维产生丁酸盐，高脂小鼠口服柔嫩梭菌群可减少脂肪组织炎症，增加肠道完整性^[18]。拟杆菌属(*Bacteroides*)由相对丰度4.49%增加到18.91%，双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)也有小幅增加 *Blautia* 中的 *Ruminococcus_sp_5_1_1*

39BFAA 丰度由 1.90%增加到 8.19%。属水平上 2 组中的优势菌存在差异，C 组中主要优势菌为柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)。对以上数据分析可知，槟榔籽多酚与已经报道的植物多酚功效并不完全一致，在短期发酵过程中可以增加物种丰度，但不会促进肠道中 SCFAs 的积累。

另外在属水平相对丰度排名前30的菌群中发现萨

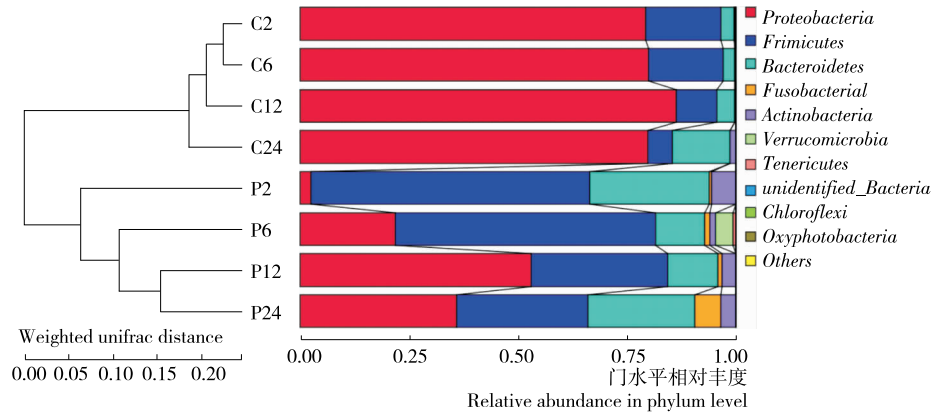


图 3 基于 Weighted UniFrac 距离的 UPGMA 聚类树

Figure 3 UPGMA Cluster analysis diagram based on UniFrac distance matrix

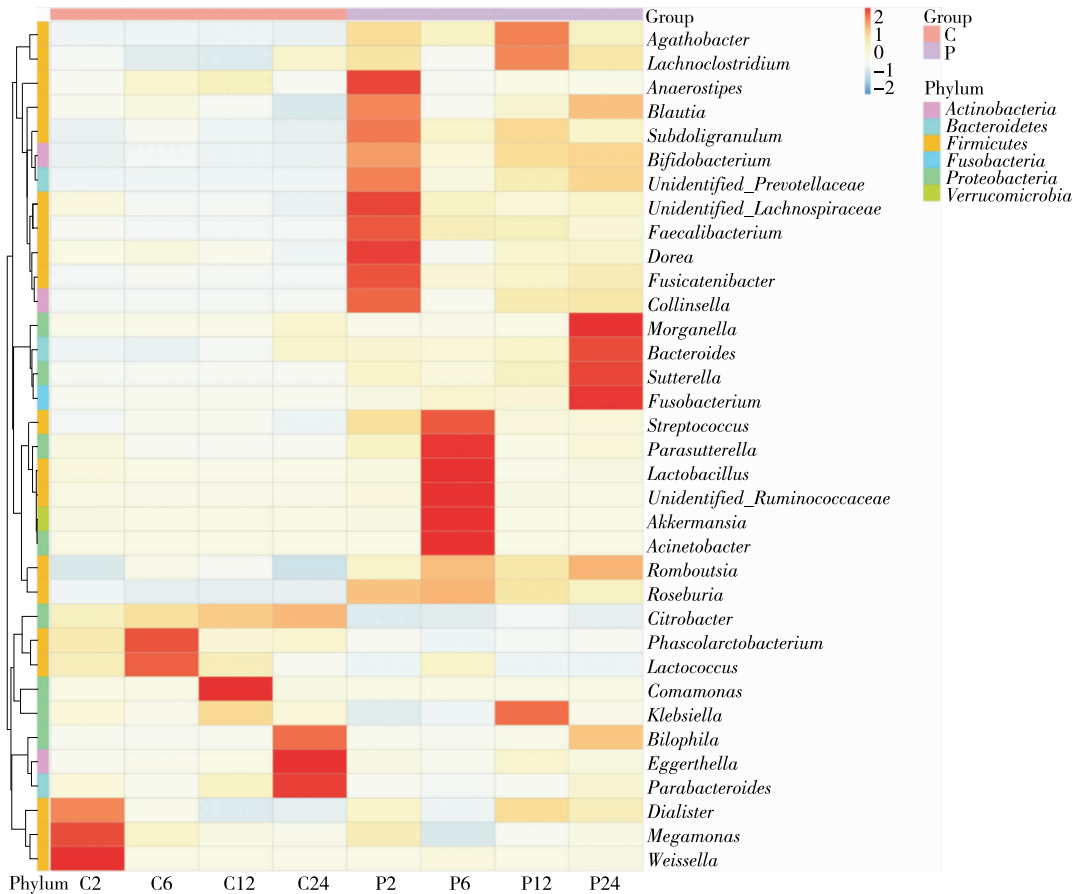


图 4 属水平上肠道菌群变化图(Heatmap 图)

Figure 4 Changes in intestinal microflora of genus level(Heatmap)

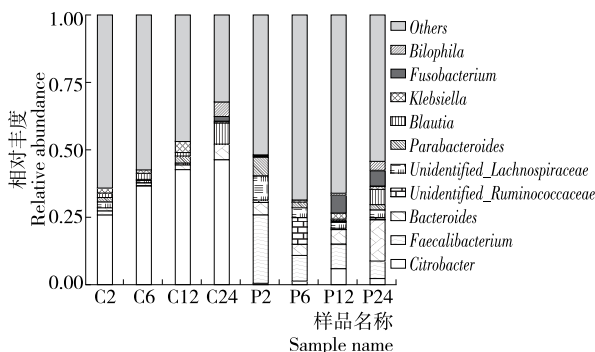


图 5 属水平上的物种相对丰度柱形图

Figure 5 Histogram of relative abundance of species at genus level

特氏菌(*Sutterella*)属在 P 组中相对丰度高于 C 组,并在 12~24 h 时呈直线增加,LU 等^[19]在利用林可霉素建立致腹泻的小鼠模型时也发现,萨特氏菌在腹泻小鼠中的丰度明显比正常小鼠高,止泻后体内萨特氏菌属数量明显下降,萨特氏菌属很可能是槟榔过量食用引起腹泻的一类微生物。

3 结论

本试验从肠道微生物的角度发现高浓度槟榔籽多酚对肠道环境和肠道菌群的影响是多面的,槟榔籽多酚的加入对发酵环境的 pH 变化趋势无影响,但会在发酵的 2~6 h 时减缓环境中的 pH 降低,这可能是通过减缓短链脂肪酸的积累实现。同时槟榔籽多酚对肠道菌群的改变非常明显,尤其是高浓度条件下,肠道中的优势菌群会迅速发生改变,24 h 内保持发酵环境中槟榔籽多酚的高浓度状态可防止菌群的自我恢复,并使柔嫩梭菌属(*Faecalibacterium*)一直处于优势状态。槟榔籽多酚对肠道菌群的影响与其他植物多酚相比存在差异,后续试验中会增加大样本量,增加浓度变化来协助阐明这种变化产生的原因。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 2010 版. 北京:中国医药科技出版社,2010.

[2] 吕俊辰,弓宝,孙佩文. 槟榔药用和食用安全性研究概况[J]. 中草药,2017(2):384-390.

[3] GUPTA P C, WARNAKULASURIYA S. Global epidemiology of areca nut usage[J]. *Addiction Biology*, 2010, 7(1): 77-83.

[4] ZHAO Li-ping, SHEN Jiang. Whole-body systems approaches for gut microbiota-targeted, preventive healthcare[J]. *Journal of Biotechnology*, 2010, 149(3): 183-190.

[5] LOPEZ C A, MILLER B M, RIVERACHÁVEZ F, et al. Virulence factors enhance *Citrobacter rodentium* expansion through aerobic respiration[J]. *Science*, 2011, 353(6 305):

1 249-1 253.

[6] 杨阳,张鑫,翁佩芳,等. 茶叶儿茶素的益生元活性研究[J]. 现代食品科技,2015(4):128-136.

[7] RYCROFT C E, JONES M R, GIBSON G R, et al. A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, 91(5): 878-887.

[8] 吴根梁,侯爱香,李珂,等. 陈年茯砖茶多酚类对老年人肠道菌群的影响研究[J]. 茶叶科学,2018,38(3):319-330.

[9] 耿梅梅,许丽卫,袁红朝,等. 气相色谱法测定猪结肠内容物中短链脂肪酸含量[J]. 现代生物医学进展,2015,15(6):1 010-1 014.

[10] MARTIN M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads [J]. *Embnet Journal*, 2011, 17(1): 10-12.

[11] HAAS B J, GEVERS D, EARL A M, et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons [J]. *Genome Research*, 2011, 21(3): 494-504.

[12] MAGOC T, SALZBERG S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2 957-2 963.

[13] SCHLOSS P D, WESTCOTT S L, RYABIN T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2009, 75(23): 7 537-7 541.

[14] SCHANTZ M, ERK T, RICHLING E. Metabolism of green tea catechins by the human small intestine[J]. *Biotechnology Journal*, 2010, 5(10): 1 050-1 059.

[15] 李丹,初阳,杨倩. 茶多酚在大鼠肠道的吸收动力学研究[J]. 中国医科大学学报,2014,43(10):914-916.

[16] 刘松珍,张雁,张名位,等. 肠道短链脂肪酸产生机制及生理功能的研究进展[J]. 广东农业科学,2013,40(11):99-103.

[17] OKEEFE S J D, Keefe. Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016, 13(12): 691-706.

[18] MUNUKKA E, RINTALA A, TOIVONEN R, et al. Faecalibacterium prausnitzii treatment improves hepatic health and reduces adipose tissue inflammation in high-fat fed mice[J]. *Isme Journal*, 2017, 11(7): 1 667-1 679.

[19] LU Wei-jie, LIU Gui, YE Chun-xin, et al. Structural modulation of gut microbiota during alleviation of antibiotic-associated diarrhea with herbal formula [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 105(3): 1 622-1 629.

(本文系 2018 年湖南省研究生创新论坛一等奖论文)