

抗性淀粉饮食模式下 *L*-茶氨酸对大鼠肠道免疫功能的调节作用

Effect of *L*-theanine on intestinal immunity of rats under resistant starch feeding

屈青云¹ 许伟¹ 胡源¹ 李银花¹ 龚志华¹ 肖文军^{1,2}

QU Qing-yun¹ XU Wei¹ HU Yuan¹ LI Yin-hua¹ GONG Zhi-hua¹ XIAO Wen-jun^{1,2}

(1. 湖南农业大学茶学教育部重点实验室, 湖南 长沙 410128; 2. 湖南农业大学国家植物功能成分

利用工程技术研究中心, 湖南 长沙 410128)

(1. Key Lab of Tea Science of Ministry of Education, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2. National Research Center of Engineering Technology for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

摘要:目的:探究抗性淀粉饮食模式下 *L*-茶氨酸对大鼠肠道免疫功能的调节作用。方法:通过对抗性淀粉饮食模式下 4 周龄 SD 雄性大鼠进行 28 d 不同剂量 *L*-茶氨酸 [100, 300, 500 mg/(kg · d)] 干预试验,考察抗性淀粉与 *L*-茶氨酸组合营养对大鼠肠道免疫功能的调节作用。结果:在抗性淀粉饮食模式下,中、高剂量组 *L*-茶氨酸能显著增加大鼠体重,提高回肠组织超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性,降低回肠丙二醛(MDA)含量;各剂量组均能显著增加回肠白介素-4(IL-4)、白介素-10(IL-10)的表达量,抑制白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的表达量,提高免疫球蛋白 A (IgA) 的表达水平,同时能增加各小肠肠段谷氨酸(Glu)、谷氨酰胺(Gln)含量,提高双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、普雷沃菌属 9 (*Prevotella_9*)、布劳特氏菌属(*Blautia*)等有益菌丰度,降低肠道有害菌幽门螺杆菌属(*Helicobacter*)和副萨特氏菌属(*Parasutterella*)占比($P < 0.05$),其中,中剂量 *L*-茶氨酸[300 mg/(kg · d)] 效果最佳。结论:抗性淀粉饮食模式下 *L*-茶氨酸对大鼠肠道免疫功能具有提高抗氧化能力、平衡促炎/抗炎因子、升高 Glu 与 Gln 含量、改善肠道菌群结构等调节作用。

关键词:抗性淀粉; *L*-茶氨酸; 饮食模式; 营养干预; 肠道免疫

Abstract: Objective: This study aimed to explore the effect of *L*-

theanine on intestinal immunity of rats under resistant starch feeding. **Methods:** Different doses of *L*-theanine [100, 300, 500 mg/(kg · d)] was performed for 28 days in 4-week-old SD male rats by filling the stomach once daily under resistant starch feeding, in order to investigate the regulation of resistant starch combined with *L*-theanine on intestinal immunity. **Results:** The results were shown as follows the medium and high dose groups of *L*-theanine significantly increased the weight of rats, and improved the activities of ileum SOD, GSH-Px with reducing the content of MDA under resistant starch feeding; Pretreatment with *L*-theanine at different dosages improved the expressions of IL-4, IL-10, lowered the levels of IL-6, TNF- α , increased the level of IgA in ileum significantly. At the same time, *L*-theanine could heighten the contents of glutamate and glutamine in each small intestine, and improve the relative abundance of beneficial microorganisms such as *Bifidobacterium*, *Prevotella_9*, *Blautia* reducing the proportion of intestinal harmful microorganisms *Helicobacter* and *Parasutterella* ($P < 0.05$). Consequently, the medium dose group of *L*-theanine [300 mg/(kg · d)] combined with resistant starch had the best effect. **Conclusion:** Under the resistant starch feeding, *L*-theanine can enhance intestinal immunity of rats by improving antioxidant capacity, balancing the levels of pro-inflammatory and anti-inflammatory factors and raising the contents of glutamate and glutamine. In addition, it can also ameliorate the structure of intestinal bacteria to affect intestinal immunity.

Keywords: resistant starch; *L*-theanine; dietary pattern; nutrition intervention; intestinal immunity

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:31871804)

作者简介:屈青云,女,湖南农业大学在读硕士研究生。

通信作者:肖文军(1969—),男,湖南农业大学教授,博士。

E-mail: xiaowenjun88@sina.com

收稿日期:2021-08-02

肠道是机体消化吸收营养物质的场所,也是重要的免疫器官,肠道免疫功能的提高对维持内环境自稳衡、提

高机体抗病能力具有重要作用^[1-2]。通过膳食营养干预来保护肠道完整性、减轻肠道炎症、维护肠道菌群微生态平衡已成为一种提高肠道免疫功能的有效途径^[3-4]。随着人们生活水平的提高,采用多元化的营养素进行肠内营养是现代膳食营养的重要发展方向。研究^[5]发现,谷氨酰胺联合膳食纤维强化肠内营养能较好地维持肠道正常适度的免疫反应,减轻过度的炎症反应,提高肠道黏膜免疫能力。其中,谷氨酰胺是肠道免疫重要关联物质,主要依靠其他器官合成或外源性摄入,可促进肠道细胞因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 的产生,对调节细胞免疫具有重要作用^[6];膳食纤维可在肠道微生物的作用下发酵形成短链脂肪酸(SCFAs),其在肠道供能、改善肠道形态结构、增强肠道免疫功能等方面发挥积极作用^[7]。

常见的膳食纤维主要有纤维素、半纤维素、果胶、树胶和木质素等^[8]。抗性淀粉(RS)是一种极具潜力的新型膳食纤维,不仅在持水力、色泽、口感等方面拥有更好的性能,而且具有调节肠道 pH 值、预防结肠癌、改善肠道菌群和提高肠道免疫力等作用^[9-10]。但抗性淀粉的长期摄入对肠道内环境的积极作用会逐渐减弱,且由于 RS 在小肠中不易被酶消化,其在肠道中的存在也会影响肠道内容物的物理特性,从而改变小肠消化和营养吸收的程度^[11]。L-茶氨酸(L-theanine)是茶叶中一种特征性氨基酸,与谷氨酰胺结构类似,不仅可以作为一种外源营养补充物质,同时可通过改善肠道结构、促进免疫球蛋白分泌、降低白介素含量、下调炎症因子水平等途径提高肠道免疫力^[12],此外,氨基酸发酵也可产生大量的 SCFAs^[13]。由此可见,抗性淀粉与 L-茶氨酸均有利于肠道健康,但其组合营养是否具有协同增效作用还有待进一步探究。为此,试验拟通过不同剂量 L-茶氨酸灌胃干预抗性淀粉饮食模式下的 SD 雄性大鼠 28 d,研究分析抗性淀粉和 L-茶氨酸的组合肠内营养对大鼠肠道免疫功能的调节作用,以期食品营养干预多元化发展、改善肠道免疫功能以及 L-茶氨酸的深层次利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

L-茶氨酸:纯度 $\geq 98\%$,湖南三福生物科技有限公司;

抗性淀粉 II(商标号:Fibersol-2):上海友山生物科技有限公司;

抗性淀粉饲料:参照文献^[14]了解抗性淀粉的功能及营养配比后,委托湖南斯莱克景达实验动物有限公司,在基础饲料配方上添加抗性淀粉 II 制成,其组成:2%抗性淀粉 II,18%蛋白质(供能比 24.7%),58%碳水化合物(供能比 67.1%),4.8%脂质(供能比 8.2%)和 3%矿物质;

谷氨酰胺(Gln)、白介素-4(IL-4)、白介素-6(IL-6)、白

介素-10(IL-10)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、免疫球蛋白 A(IgA) ELISA 试剂盒:上海茁彩生物科技有限公司;

谷氨酸(Glu)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)、诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)试剂盒:南京建成生物工程研究所;

SD 雄性大鼠:SPF 级 4 周龄,湖南斯莱克景达实验动物有限公司。

1.2 主要仪器设备

多功能酶标仪:Varioskan Flash 型,赛默飞世尔上海仪器有限公司;

台式冷冻离心机:MIKRO22R 型,德国 Hettich 公司;

移液枪:Reerach Plus 型,德国 Eppendorf 公司;

全自动样品快速研磨仪:JXFSTPRP-48 型,上海净信实业发展有限公司;

紫外可见分光光度计:UV-2550 型,日本 Shimadzu 公司。

1.3 方法

1.3.1 动物试验设计 所有涉及动物的试验程序严格按照湖南农业大学伦理委员会《动物护理和使用指南》进行(注册号:015063506)。试验动物选择 SPF 级 4 周龄 SD 雄性大鼠,饲养条件:温度(25 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$ 、湿度(50%~70%),12 h 的光/暗周期,保持动物房空气流通。大鼠分组前适应性喂养 1 周,期间自由进食饮水。

将 50 只大鼠按体重随机分为基础饲料对照组(CK A)、抗性淀粉饲料对照组(CK B)和 L-茶氨酸低剂量组(LTA 100)、中剂量组(LTA 300)、高剂量组(LTA 500)共 5 组,每组 10 只,喂养周期为 28 d,大鼠分组及喂养如表 1 所示。

1.3.2 样品采集与检测 末次灌胃后,经禁食 12 h,收集各组大鼠粪便,置于干燥的灭菌试管中,随后注射戊巴比妥钠溶液麻醉大鼠,解剖收集每只大鼠的十二指肠、空肠、回肠组织,粪便与肠道组织均-80 $^{\circ}\text{C}$ 贮藏备用。试验指标检测严格按照试剂盒操作。

1.3.3 肠道微生物 DNA 提取与测序 使用 EZNA Soil DNA 试剂盒对大鼠粪便进行总 DNA 抽提,使用特异引物对粪便中细菌 16S rDNA 的 V3-V4 可变区进行 PCR

表 1 大鼠分组及喂养

Table 1 The grouping and feeding of rats

组别	饲料	剂量/(mg $\cdot$ kg $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$)
CK A	基础饲料	生理盐水
CK B	抗性淀粉饲料	生理盐水
LTA 100	抗性淀粉饲料	100
LTA 300	抗性淀粉饲料	300
LTA 500	抗性淀粉饲料	500

扩增、纯化,以及文库模板的富集和测序文库的构建,随后在 Illumina Miseq PE300 平台上进行测序。

测序数据经使用 Trimmomatic 软件质控、FLASH 拼接、Verseach 过滤得到优质序列,利用软件 Uparse 对所有样品的有效数据进行聚类,将具有 97%一致性序列聚类成为操作单元(OTUs),采用 RDP Classifier 对 OTUs 代表序列进行分类和注释,与 Silva(SSU123)数据库进行比对,置信水平设置为 70%。基于样品 OTUs 结果,使用 Mothur 软件对样品进行 Alpha 多样性分析,并在门与属分类水平上,进行肠道菌群结构分析。

1.3.4 统计分析方法 试验数据以平均值±标准差表示,采用 SPSS 25.0 进行统计分析,数据采用单因素方差分析(ANOVA),最小显著差数法(LSD)和邓肯(Duncan)检验, $P < 0.05$ 时为具有统计学显著性差异。使用

GraphPad Prism 8.0.1 软件作图。

2 结果与分析

2.1 抗性淀粉饮食模式下 L-茶氨酸对大鼠体重与采食量的影响

表 2 显示,各处理组日均采食量无显著差异($P > 0.05$)。与 CK A 组相比,CK B 组大鼠体重稍下降($P > 0.05$),可能与抗性淀粉降低机体脂肪沉积量有关^[15]。与 CK B 组相比,LTA 300、LTA 500 组大鼠体重变化量显著增加($P < 0.05$),说明抗性淀粉饮食模式下 L-茶氨酸能促进大鼠生长,与童海鸥等^[16]的结论基本一致。

2.2 抗性淀粉饮食模式下 L-茶氨酸对大鼠回肠组织酶活性及 MDA 含量的影响

如图 1 所示,与 CK A 组相比,CK B 组大鼠回肠组织

表 2 抗性淀粉饮食模式下 L-茶氨酸对大鼠体重变化量与日均采食量的影响[†]
Table 2 Effects of L-theanine on the weight change and average daily feed intake of rats under resistant starch feeding

组别	体重					体重变化量	日均采食量
	第 0 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天		
CK A	161.73±6.62 ^a	233.22±12.97 ^a	304.71±13.76 ^a	358.31±13.88 ^a	388.41±16.92 ^a	226.35±12.60 ^{ab}	24.25±1.17 ^a
CK B	168.61±13.05 ^a	241.91±9.14 ^a	316.26±11.61 ^a	349.12±24.60 ^a	377.33±29.92 ^a	209.12±33.52 ^b	23.28±1.64 ^a
LTA 100	166.71±10.61 ^a	240.33±11.26 ^a	304.11±16.54 ^a	356.22±23.43 ^a	389.44±34.09 ^a	223.42±25.08 ^{ab}	24.09±0.97 ^a
LTA 300	171.24±15.11 ^a	249.65±17.01 ^a	315.86±19.99 ^a	359.33±13.88 ^a	402.71±16.03 ^a	231.87±14.29 ^a	24.16±1.24 ^a
LTA 500	163.93±10.74 ^a	241.97±11.86 ^a	307.81±16.98 ^a	353.67±22.64 ^a	397.19±27.32 ^a	234.12±19.23 ^a	24.27±0.75 ^a

[†] 同列小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

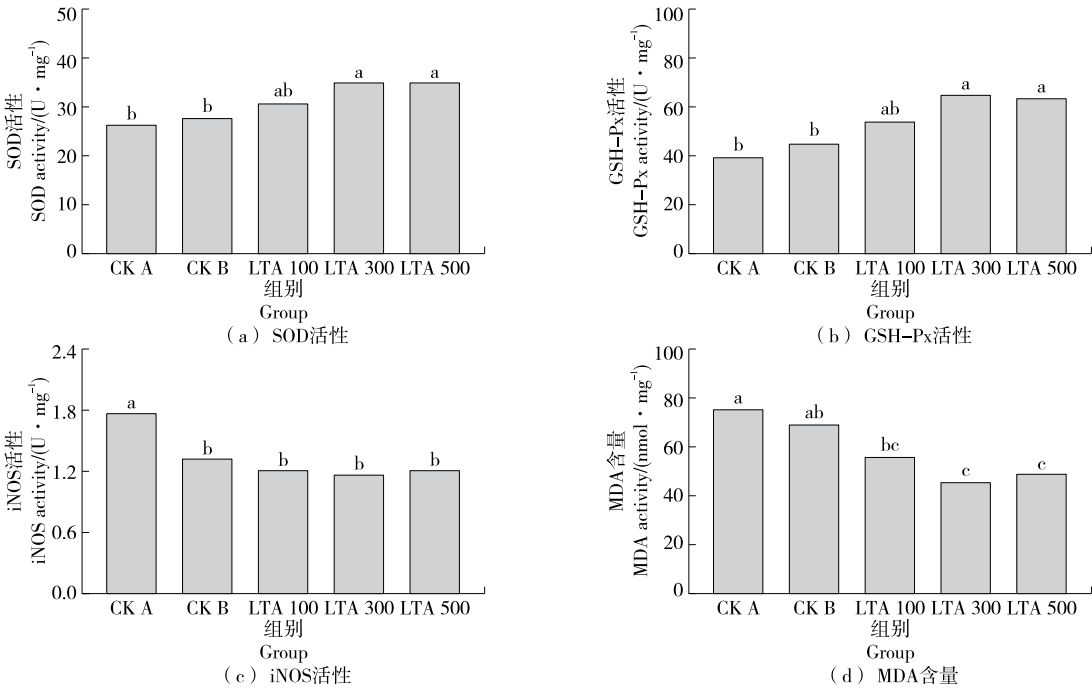
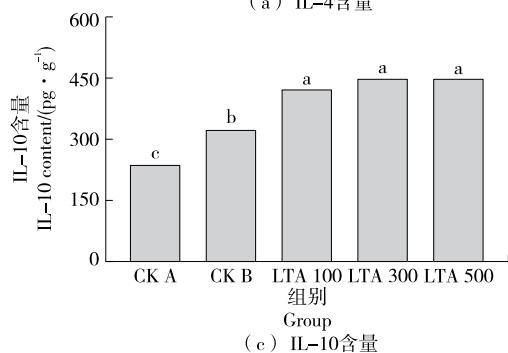
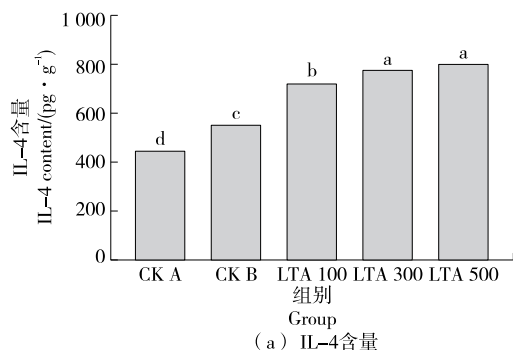


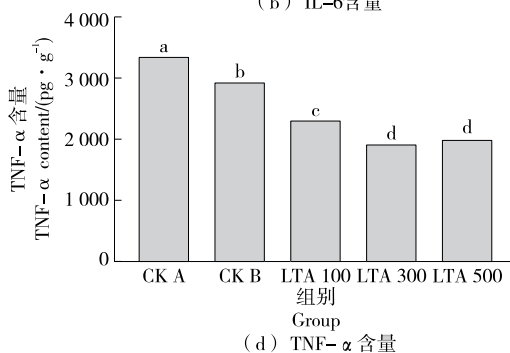
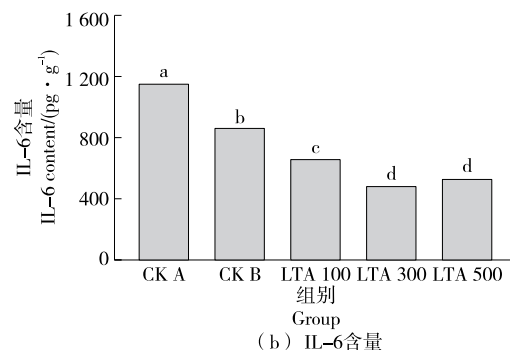
图 1 抗性淀粉饮食模式下 L-茶氨酸对大鼠回肠组织中 SOD、GSH-Px、iNOS 活性和 MDA 含量的影响
Figure 1 Effects of L-theanine on SOD, GSH-Px, iNOS activities and MDA content in ileum of rats under resistant starch feeding

中 SOD、GSH-Px 活性升高, iNOS 活性和 MDA 含量降低, 其中 iNOS 达到显著水平 ($P < 0.05$)。与 CK B 组相比, LTA 300、LTA 500 组均能增加大鼠回肠组织中 SOD、GSH-Px 活性 ($P < 0.05$), 降低 MDA 含量 ($P < 0.05$)。由于肠道系统不仅是代谢部位, 也是宿主和微生物之间的作用位点, 肠道细胞新陈代谢、日粮成分氧化、肠道微生物改变等均会影响肠道氧化与抗氧化系统的平衡^[17]。由此说明抗性淀粉饮食模式下 *L*-茶氨酸能提高 SOD、GSH-Px 活性, 抑制 iNOS 活性及减少 MDA 形成来平衡肠道自由基, 维护肠道健康。



2.3 抗性淀粉饮食模式下 *L*-茶氨酸对大鼠回肠细胞因子表达水平的影响

由图 2 可知, 与 CK A 组相比, CK B 组大鼠回肠 IL-4、IL-10 表达量显著升高 ($P < 0.05$), IL-6、TNF- α 表达量显著降低 ($P < 0.05$), 说明抗性淀粉可通过改善炎症因子水平来平衡肠道稳态, 与曹承嘉^[18]的研究结果相符。与 CK B 组相比, 各 *L*-茶氨酸剂量组 IL-4、IL-10 表达量显著升高 ($P < 0.05$), IL-6、TNF- α 表达量显著降低 ($P < 0.05$), 说明在抗性淀粉饮食模式下, *L*-茶氨酸干预可进一步调节促炎/抗炎因子平衡, 且具有剂量依赖效应。



小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 2 抗性淀粉饮食模式下 *L*-茶氨酸对大鼠回肠中细胞因子表达量的影响

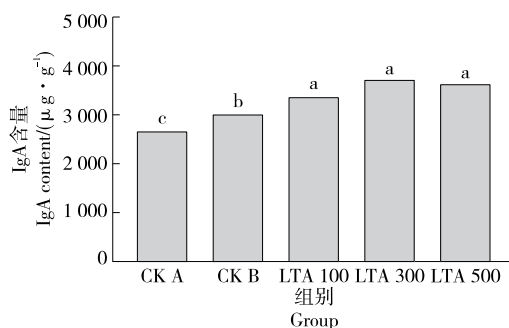
Figure 2 Effects of *L*-theanine on the levels of cytokines in ileum of rats under resistant starch feeding

2.4 抗性淀粉饮食模式下 *L*-茶氨酸对大鼠回肠 IgA 的影响

由图 3 可知, 与 CK A 组相比, CK B 组大鼠回肠 IgA 含量显著增加 ($P < 0.05$)。与 CK B 相比, 各 *L*-茶氨酸剂量组 IgA 含量显著升高 ($P < 0.05$), 其中, 以 LTA 300 组效果最佳, 由此提示抗性淀粉饮食模式下 *L*-茶氨酸能通过促进 IgA 分泌增强肠道免疫应答^[19]。

2.5 抗性淀粉饮食模式下 *L*-茶氨酸对大鼠肠道 Glu、Gln 的影响

由表 3 可知, 与 CK A 组相比, CK B 组肠道 Glu、Gln 的含量降低, 且空肠和十二指肠达到显著水平 ($P < 0.05$), 可能与抗性淀粉降低肠道氮的吸收和促进大肠微生物发酵而增加微生物蛋白质合成有关^[20], 同时回肠 Glu、Gln 含量有所降低, 但并不显著 ($P > 0.05$), 可能是抗



小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 3 抗性淀粉饮食模式下 *L*-茶氨酸对大鼠回肠中 IgA 含量的影响

Figure 3 Effect of *L*-theanine on the content of IgA in ileum of rats under resistant starch feeding

表 3 抗性淀粉饮食模式下 *L*-茶氨酸对大鼠肠道 Glu、Gln 的影响[†]Table 3 Effects of *L*-theanine on the contents of Glu and Gln in intestinal of rats under resistant starch feeding

组别	十二指肠		空肠		回肠	
	Glu	Gln	Glu	Gln	Glu	Gln
CK A	113.17±20.04 ^a	13.27±1.29 ^a	138.24±17.10 ^a	14.31±1.78 ^a	99.98±11.55 ^b	10.35±1.64 ^{ab}
CK B	64.02±9.85 ^c	6.61±0.86 ^d	97.58±6.39 ^d	8.50±1.02 ^d	96.24±6.69 ^b	9.43±1.38 ^b
LTA 100	79.01±7.76 ^{bc}	9.19±1.08 ^c	107.38±17.74 ^{cd}	10.40±1.25 ^c	100.93±11.48 ^b	9.82±0.93 ^{ab}
LTA 300	84.84±11.74 ^b	11.59±1.16 ^b	116.62±12.86 ^{bc}	12.59±1.20 ^b	106.83±13.87 ^{ab}	11.42±0.56 ^a
LTA 500	92.85±16.87 ^b	11.83±1.52 ^b	128.13±23.85 ^{ab}	12.94±1.21 ^b	120.44±6.03 ^a	11.32±1.54 ^a

[†] 同列小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

性淀粉在小肠后段消化率较高的缘故^[21]。与 CK B 组相比,不同剂量的 *L*-茶氨酸干预均增加了肠道 Glu、Gln 的含量,其中 LTA 100 组十二指肠、空肠 Gln, LTA 300 组十二指肠、空肠 Glu 以及十二指肠、空肠、回肠 Gln, LTA 500 组十二指肠、空肠、回肠中 Glu 和 Gln 含量达到显著水平($P<0.05$),说明抗性淀粉饮食模式下 *L*-茶氨酸干预能提高肠道 Glu 和 Gln 的含量,一方面可能是由于 *L*-茶氨酸能改善肠道形态结构并促进肠道营养吸收^[22],另一方面, *L*-茶氨酸降解可增加 Gln 合成底物 Glu 的浓度,并通过提高骨骼肌中谷氨酰胺合成酶活性和促进肠道谷氨酰胺酶蛋白的翻译和修饰影响肠道 Gln 代谢^[12]。

2.6 抗性淀粉饮食模式下 *L*-茶氨酸对大鼠肠道菌群的影响

如表 4 所示,5 组样本的测序深度指数在 99.70%~99.80%,说明测序深度足以反映样本中所包含的绝大多数序列,能进行下一步分析。LTA 500 组 ACE、Chao、Shannon 指数最大,其中 ACE 指数与 CK B 组相比达到显著水平($P<0.05$),各 *L*-茶氨酸剂量组 Simpson 指数显著降低($P<0.05$)。由此提示,抗性淀粉联合 *L*-茶氨酸进行营养干预能提高大鼠肠道微生物丰富度和多样性,进而影响肠道菌群组成。

原始测序结果经过质控优化后在分类学上共得到 805 个 OTUs,可划分为 13 个门,19 个纲,31 个目,57 个科,161 个属,287 个种。图 4 显示,各组样本在门水平上群落结构差异不大,主要由拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、厚

壁菌门(*Firmicutes*)、螺旋体门(*Spirochaetes*)、ε-变形菌门(*Epsilonbacteraeota*)、变形菌门(*Proteobacteria*)和放线菌门(*Actinobacteria*)6 个门构成,其中拟杆菌门和厚壁菌门占绝对优势,约占总序列数的 90%,与 Ericsson 等^[23]的研究结果一致。由图 4 及表 5 可知,与 CK A 组相比,CK B 组厚壁菌门相对丰度下降,拟杆菌门相对丰度增加,二者比值有所上升($P>0.05$)。拟杆菌门在碳水化合物发酵、含氮物质的利用、抵抗病原体定植和促进肠道菌群平衡等活动中发挥重要作用^[24],同时,拟杆菌门与厚壁菌门的比值与动物机体的能量代谢相关^[25]。Kyu-Ho 等^[15]研究发现,高膳食纤维补充日粮能显著降低正常饮食大鼠肠道厚壁菌门与拟杆菌门的比值,与试验结果相符。与 CK B 组相比, *L*-茶氨酸各剂量组均能降低厚壁菌门,提高拟杆菌门的相对丰度,并降低其比值($P>0.05$),提示抗性淀粉饮食模式下 *L*-茶氨酸可能具有调节宿主能量代谢的作用。

图 5 表明,在属的分类学水平上,5 组样本中的主要优势菌属有普雷沃菌属 9(*Prevotella*_9)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、副杆菌属(*Parabacteroides*)和鼠杆菌科未命名属(*Muribaculaceae_norank*),4 个属相对丰度占比 50%以上,选取相对丰度前 30 位的属进行显著性差异分析,得到表 6。由表 6 可知,与 CK A 组相比,CK B 组副杆菌属、毛螺菌科未命名属(*Lachnospiraceae_norank*)、瘤胃梭菌属 5(*Ruminiclostridium*_5)、木质真菌属

表 4 抗性淀粉饮食模式下 *L*-茶氨酸对大鼠肠道菌群丰富度及多样性的影响[†]Table 4 Effects of *L*-theanine on the richness and diversity of intestinal bacteria in rats under resistant starch feeding

组别	ACE 指数	Chao 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	测序深度指数/%
CK A	533.82±31.27 ^b	541.58±31.81 ^b	3.90±0.40 ^b	0.06±0.01 ^a	99.76±0.00 ^a
CK B	551.09±25.42 ^b	566.33±23.13 ^{ab}	3.93±0.19 ^{ab}	0.06±0.01 ^a	99.76±0.00 ^a
LTA 100	568.72±20.19 ^{ab}	568.15±20.68 ^{ab}	4.30±0.21 ^{ab}	0.04±0.01 ^b	99.79±0.00 ^a
LTA 300	577.37±14.06 ^{ab}	577.55±15.41 ^{ab}	4.28±0.14 ^{ab}	0.04±0.00 ^b	99.72±0.00 ^a
LTA 500	604.31±22.43 ^a	601.46±31.75 ^a	4.37±0.11 ^a	0.04±0.01 ^b	99.76±0.00 ^a

[†] 同列小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

(*[Eubacterium]_xylanophilum_group*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)和布劳特氏菌属(*Blautia*)丰度显著增加($P<0.05$),拟普雷沃氏菌属(*Alloprevotella*)、幽门螺杆菌属(*Helicobacter*)、副萨特氏菌属(*Parasutterella*)丰度显著降低($P<0.05$)。而

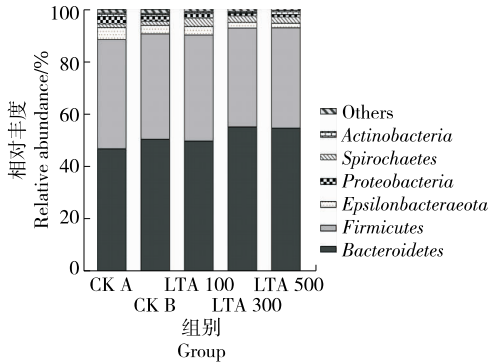


图 4 抗性淀粉饮食模式下 L-茶氨酸对门水平上的大鼠肠道菌群结构的影响

Figure 4 Effect of *L*-theanine on the structure of intestinal bacteria in rats at gate level under resistant starch feeding

表 5 抗性淀粉饮食模式下 L-茶氨酸对大鼠肠道菌群厚壁菌门与拟杆菌门相对丰度及其比值的影响

Table 5 Effects of *L*-theanine on the relative abundance and ratio of *Firmicutes* and *Bacteroidetes* of intestinal bacteria in rats under resistant starch feeding

组别	厚壁菌门/%	拟杆菌门/%	厚壁菌门/拟杆菌门
CK A	41.67±7.31	46.89±8.76	0.93±0.31
CK B	40.04±12.82	50.63±13.05	0.87±0.27
LTA 100	40.38±7.91	49.90±8.35	0.84±0.30
LTA 300	37.61±10.85	55.26±11.70	0.73±0.19
LTA 500	38.20±6.92	54.78±7.50	0.72±0.23

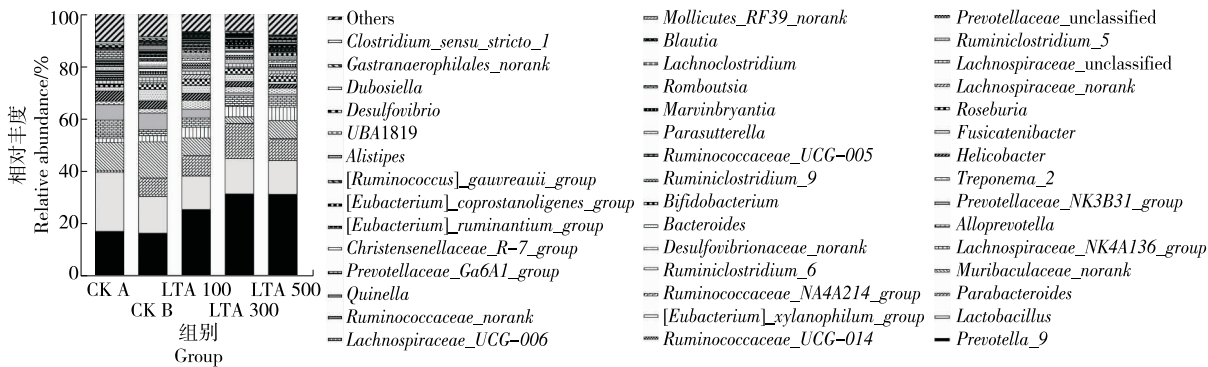


图 5 抗性淀粉饮食模式下 L-茶氨酸对属水平上的大鼠肠道菌群结构的影响

Figure 5 Effect of *L*-theanine on the structure of intestinal bacteria in rats at genus level under resistant starch feeding

L-茶氨酸可进一步改善抗性淀粉饮食模式下的肠道菌群结构。与 CK B 组相比,LTA 300 组显著上调副杆菌属,显著下调鼠杆菌科未命名属的相对丰度($P<0.05$);LTA 500 组显著上调毛螺菌科 NK4A136 群属(*Lachnospiraceae_NK4A136_group*)和双歧杆菌属的相对丰度($P<0.05$);LTA 300、LTA 500 组均能显著上调普雷沃菌属 9 和布劳特氏菌属,下调普雷沃菌科 NK3B31 群属(*Prevotellaceae_NK3B31_group*)、幽门螺杆菌属和副萨特氏菌属的相对丰度($P<0.05$)。双歧杆菌属是一种常见益生菌,不仅能抑制有害细菌和炎症细胞因子分泌,还可改变树突状细胞的功能,以调节肠道对无害抗原和细菌的免疫稳态^[26];副杆菌属、普雷沃菌属 9、布劳特氏菌属由于与免疫关联物质 SCFAs 的产生有关,被认为是益生菌或潜在益生菌。SCFAs 是抗性淀粉在大肠内被肠道菌群发酵利用产生的主要代谢产物,包括乙酸、丙酸和丁酸等^[27]。副杆菌属主要代谢终产物为有益的乙酸、丙酸,帮助调节肠道菌群^[28];普雷沃菌属 9、布劳特氏菌属参与丁酸盐的产生,为肠道上皮细胞提供能源^[29]。与 CK A 组相比,CK B 组双歧杆菌属、副杆菌属、布劳特氏菌属等菌属丰度增加($P<0.05$),说明抗性淀粉能通过影响 SCFAs 产生而促进肠道有益菌的生长。与 CK B 组相比,LTA 300、LTA 500 组普雷沃菌属 9、副杆菌属、布劳特氏菌属丰度显著增加($P<0.05$),可能是 L-茶氨酸能很好地被肠道微生物发酵利用,进而生成 SCFAs^[30]⁴⁵⁻⁵⁰,影响肠道内环境、促进肠道有益菌生长的原因。幽门螺杆菌属、副萨特氏菌属与肠道健康呈负相关,幽门螺杆菌属是一种慢性致病菌,定植在机体内易引起炎症^[31];副萨特氏菌属丰度增加会导致菌群紊乱,易引起肠易激综合征、科恩氏病^[32]。表 6 中,与 CK A 组相比,CK B 组幽门螺杆菌、副萨特氏菌等菌属丰度降低($P<0.05$),可能与抗性淀粉降低肠道 pH 值,抑制部分有害菌群生长有关^[33]。与 CK B 组相比,LTA 300、LTA 500 组幽门螺杆菌、副萨特氏菌丰度显著降低($P<0.05$),可能是由于 L-茶氨酸能

表 6 抗性淀粉饮食模式下 *L*-茶氨酸对大鼠肠道菌群优势属相对丰度的影响[†]Table 6 Effects of *L*-theanine on the relative abundance of intestinal bacteria in rats at main genus under resistant starch feeding

属	相对丰度/%				
	CK A	CK B	LTA100	LTA300	LTA500
普雷沃菌属 9	16.90±4.22 ^b	16.17±3.69 ^b	25.23±5.49 ^{ab}	31.18±6.83 ^a	31.07±8.09 ^a
副杆菌属	0.53±0.19 ^c	6.99±2.15 ^b	7.89±2.51 ^{ab}	13.48±3.29 ^a	9.27±2.40 ^{ab}
鼠杆菌科未命名属	10.81±2.04 ^a	13.90±3.66 ^a	6.71±1.87 ^{ab}	2.50±1.09 ^b	6.93±2.17 ^{ab}
毛螺菌科 NK4A136 群属	1.65±0.39 ^b	2.27±0.82 ^b	4.15±1.40 ^{ab}	3.90±1.06 ^{ab}	5.22±2.01 ^a
拟普雷沃氏菌属	7.01±1.42 ^a	2.20±0.67 ^b	3.48±1.46 ^b	4.07±1.42 ^{ab}	4.16±1.34 ^{ab}
普雷沃菌科 NK3B31 群属	5.83±1.21 ^a	6.49±2.12 ^a	4.41±0.79 ^{ab}	1.18±0.41 ^b	0.75±0.23 ^b
幽门螺杆菌属	4.20±0.28 ^a	3.05±0.25 ^b	2.79±0.65 ^b	1.99±0.57 ^c	1.50±0.42 ^c
毛螺菌科未命名属	0.28±0.12 ^c	0.71±0.26 ^b	1.76±0.41 ^a	0.32±0.13 ^c	1.10±0.37 ^{ab}
瘤胃梭菌属 5	0.28±0.09 ^c	0.94±0.12 ^{ab}	1.09±0.40 ^a	1.68±0.54 ^a	1.18±0.38 ^a
木质真菌属	0.39±0.11 ^b	1.04±0.34 ^a	0.97±0.19 ^a	1.05±0.35 ^a	0.90±0.31 ^a
拟杆菌属	0.40±0.14 ^b	1.57±0.43 ^a	0.69±0.29 ^{ab}	0.74±0.24 ^{ab}	0.69±0.17 ^{ab}
双歧杆菌属	0.12±0.03 ^c	0.36±0.14 ^b	0.55±0.20 ^{ab}	0.61±0.21 ^{ab}	1.12±0.28 ^a
副萨特氏菌属	1.48±0.34 ^a	0.73±0.13 ^b	0.46±0.16 ^{bc}	0.29±0.10 ^c	0.23±0.09 ^c
布劳特氏菌属	0.17±0.07 ^c	0.49±0.15 ^b	0.51±0.15 ^b	0.84±0.12 ^a	0.94±0.22 ^a

[†] 肠道微生物中相对丰度前 30 位中有显著性差异的菌属;同列小写字母不同表示差异显著 ($P<0.05$)。

促进乳酸等 SCFAs 的生成^{[30]51},进一步降低肠道 pH 值。由此可知,抗性淀粉饮食模式下 *L*-茶氨酸可通过提高肠道益生菌和潜在益生菌丰度、降低致病菌丰度来改善肠道菌群结构。

3 结论

试验表明,在抗性淀粉饮食模式下使用 *L*-茶氨酸进行营养干预,一方面能够提高肠道抗氧化能力、平衡促炎/抗炎因子、提高肠道 Glu 与 Gln 含量,增强肠道免疫应答能力。另一方面,能够通过提高肠道菌群多样性、改善肠道菌群结构来增强肠道免疫功能,但其作用机制有待进一步探究。

参考文献

- [1] 曹星星, 胡利, 何彦明, 等. sIgA 在肠道免疫和自身免疫性疾病中的研究进展[J]. 医学综述, 2021, 27(13): 2 529-2 533.
CAO Xing-xing, HU Li, HE Yan-ming, et al. Research advances of secretory immunoglobulin A in intestinal immunity and autoimmune diseases[J]. Medical Recapitulate, 2021, 27(13): 2 529-2 533.
- [2] 林峰. 畜禽肠道黏膜免疫及其影响的主要营养因素[J]. 新农业, 2020(19): 44.
LIN Feng. Animal and poultry intestinal mucosa immunity and its main nutritional factors[J]. New Agriculture, 2020(19): 44.
- [3] 秦艳枝. 大黄川芎芍药联合肠内营养治疗对危重症患者肠道功能及机体免疫功能的影响[J]. 中国民间疗法, 2021, 29(4): 75-77.
QIN Yan-zhi. Influence of nasal-fed combined intestinal nutrition

therapy of Rhubarb and Rhizoma Chuanxiong Decoction on intestinal function and body immune function in critically ill patients[J]. China's Naturopathy, 2021, 29(4): 75-77.

- [4] 唐甜, 索化夷, 李健, 等. 膳食营养与宿主遗传通过肠道菌群调节能量代谢研究进展[J]. 食品与机械, 2019, 35(3): 225-230.
TANG Tian, SUO Hua-yi, LI Jian, et al. Research progress in regulation of energy metabolism by dietary nutrition and host inheritance via intestinal flora[J]. Food & Machinery, 2019, 35(3): 225-230.
- [5] 王莉. 谷氨酰胺、膳食纤维强化的肠内营养对创伤危重症患者的支持作用[D]. 太原: 山西医科大学, 2012: 10-11.
WANG Li. Supports of glutamine and dietary fiber enhanced enteral nutrition in critically ill trauma patients [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2012: 10-11.
- [6] 王浩维, 金艺华, 李艳美. 谷氨酰胺对肠道屏障保护作用研究[J]. 广东化工, 2020, 47(24): 60, 68.
WANG Hao-wei, JIN Yi-hua, LI Yan-mei. Studies on the protective effect of glutamine on the intestinal barrier[J]. Guangdong Chemical Industry, 2020, 47(24): 60, 68.
- [7] KOH A, DE V F, KOVATCHEVA-DATCHARY P, et al. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites[J]. Cell, 2016, 165(6): 1 332-1 345.
- [8] 李森, 王赏, 王晓燕, 等. 膳食纤维调控胃肠道营养健康研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(21): 7 752-7 757.
LI Miao, WANG Shang, WANG Xiao-yan, et al. Research progress of dietary fiber regulating gastrointestinal nutrition and health[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(21): 7 752-7 757.
- [9] 殷丹婷. 外源乳酸菌对膳食纤维体外发酵产物抗结肠癌活性的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2017: 28-30.

- YLN Dan-ting. Effects of exogenous lactic acid bacteria on the anti-colon cancer activities of fermentation products of dietary fibers in vitro[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2017: 28-30.
- [10] DUAN Ya-fei, WANG Yun, LIU Qing-song, et al. Changes in the intestine microbial, digestion and immunity of *Litopenaeus vannamei* in response to dietary resistant starch[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 6 464.
- [11] STEPHEN A M, CUMMINGS J H. Mechanism of action of dietary fibre in the human colon[J]. Nature, 1980, 284(5 753): 283-284.
- [12] LIU An, GONG Zhi-hua, LIN Ling, et al. Effects of L-theanine on glutamine metabolism in enterotoxigenic *Escherichia coli* (E44813)-stressed and non-stressed rats[J]. Journal of Functional Foods, 2020, 64(C): 103670.
- [13] 张小芳, 王欣, 汪惠勤, 等. 人体肠道菌群代谢氨基酸产生短链脂肪酸及对细胞通透性的影响[J]. 中国食品学报, 2021, 21(7): 60-67.
- ZHANG Xiao-fang, WANG Xin, JIANG Hui-qin, et al. Human intestinal flora metabolite short-chain fatty acids produced from amino acids and effect on cell permeability[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(7): 60-67.
- [14] 李少艇. 基于高膳食纤维饮食研究肠道菌群与能量过度摄入的关系[D]. 广州: 暨南大学, 2015: 6-8.
- LI Shao-ting. To discover the relationship between gut microbiota and over-ingestion of energy based on high dietary-fiber diets[D]. Guangzhou: Jinan University, 2015: 6-8.
- [15] KYU-HO H, SHUNSUKE O, KEIKO S, et al. Dietary adzuki bean paste dose-dependently reduces visceral fat accumulation in rats fed a normal diet [J]. Food Research International, 2020, 130(C): 108890.
- [16] 董海鹰, 李成舰, 颜琼娟, 等. L-茶氨酸对断乳大鼠血清及肝脏氨基酸谱的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(15): 247-252.
- TONG Hai-ou, LI Cheng-jian, YAN Qiong-xian, et al. Effect of L-theanine on serum and liver amino acid compositions in weaning rats[J]. Food Science, 2016, 37(15): 247-252.
- [17] 王慧. 外源过氧化氢酶对肠道组织抗氧化能力及肠道菌群的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2016: 1-2.
- WANG Hui. Effects of exogenous catalase on tissue antioxidant capacity and intestinal microflora[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016: 1-2.
- [18] 曹承嘉. 青稞抗性淀粉的制备及其对酒精性胃损伤的保护作用研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2020: 51-53.
- CAO Cheng-jia. Preparation of barley resistance starch and its protective effect on alcohol-induced gastric injury[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2020: 51-53.
- [19] 张成, 耿照玉, 赵晓惠. L-茶氨酸的生物学功能及其在畜禽生产中的应用[J]. 南京农业大学学报, 2019, 42(4): 605-611.
- ZHANG Cheng, GENG Zhao-yu, ZHAO Xiao-hui. L-theanine: Biological functions and application in livestock and poultry production[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2019, 42(4): 605-611.
- [20] HEIJNEN M L, BEYNEN A C. Consumption of retrograded (RS3) but not uncooked (RS2) resistant starch shifts nitrogen excretion from urine to feces in cannulated piglets[J]. The Journal of Nutrition, 1997, 127(9): 1 828-1 832.
- [21] 黄思思, 周玉恒, 李赐玉, 等. 不溶性染料检测木聚糖在大鼠肠道的消化特性[J]. 基因组学与应用生物学, 2014, 33(6): 1 217-1 221.
- HUANG Si-si, ZHOU Yu-heng, LI Ci-yu, et al. Detection of digestive characteristics of xylan in rat intestine by insoluble dye[J]. Genomics and Applied Biology, 2014, 33(6): 1 217-1 221.
- [22] 彭影琦, 肖文军, 张盛, 等. L-茶氨酸对小鼠肠道形态结构及游离氨基酸的影响[J]. 茶叶科学, 2019, 39(1): 43-54.
- PENG Ying-qi, XIAO Wen-jun, ZHANG Sheng, et al. Effects of L-theanine on intestinal morphology and free amino acids in mice[J]. Journal of Tea Science, 2019, 39(1): 43-54.
- [23] ERICSSON A C, DAVIS J W, SPOLLEN W, et al. Effects of vendor and genetic background on the composition of the fecal microbiota of inbred mice[J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0116704.
- [24] ZHANG Chuan-jian, YU Miao, YANG Yu-xiang, et al. Effect of early antibiotic administration on cecal bacterial communities and their metabolic profiles in pigs fed diets with different protein levels[J]. Anaerobe, 2016, 42: 188-196.
- [25] 张玲, 陈代文, 余冰, 等. 两种类型膳食纤维对 BALB/c 小鼠结肠细菌群落结构的影响[J]. 微生物学通报, 2018, 45(2): 395-404.
- ZHANG Ling, CHEN Dai-wen, YU Bing, et al. Two dietary fibers influence the bacterial community in the colon of BALB/c mice[J]. Microbiology China, 2018, 45(2): 395-404.
- [26] AZAD M A K, SARKER M, LI T J, et al. Probiotic species in the modulation of gut microbiota: An overview[J]. BioMed Research International, 2018, 2 018: 9478630.
- [27] 谢涛, 唐雅璐, 刘艳兰, 等. 小红栲抗性淀粉的理化功能特性[J]. 食品与机械, 2019, 35(11): 47-51.
- XIE Tao, TANG Ya-lu, LIU Yan-lan, et al. Physicochemical and functional properties of resistant starch from *Castanopsis carlesii* [J]. Food & Machinery, 2019, 35(11): 47-51.
- [28] AINA G, MISAKI N, YUTA S, et al. Use of Gifu Anaerobic Medium for culturing 32 dominant species of human gut microbes and its evaluation based on short-chain fatty acids fermentation profiles[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2017, 81(10): 2 009-2 017.
- [29] 臧凯丽, 江岩, 孙勇, 等. 益生菌剂调整肠道疾病人群菌群结构丰度水平的研究[J]. 食品科学, 2018, 39(13): 133-143.
- ZANG Kai-li, JIANG Yan, SUN Yong, et al. Probiotics modulate the structure and abundance of gut microbiota in populations with intestinal diseases[J]. Food Science, 2018, 39(13): 133-143.
- [30] 葛艳. 夏秋绿茶中茶氨酸的提取分离纯化及对肠道微生态的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2013.
- GE Yan. Extraction, isolation and purification of theanine from summer-autumn green tea and its influence on intestinal microecology[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2013.

- Edulis Fungi, 2020, 27(4): 202-214.
- [11] 陆欢, 王瑞娟, 刘建雨, 等. 不同品种金针菇的营养成分分析与评价[J]. 食品与机械, 2021, 37(6): 69-75.
- LU Huan, WANG Rui-juan, LIU Xiao-feng, et al. Analysis and evaluation of nutrient components in Different Varieties of *Flammulina velutipes*[J]. Food & Machinery, 2021, 37(6): 69-75.
- [12] SELIGSON F H, MACKEY L N. Variable predictions of protein quality by chemical score due to amino acid analysis and reference pattern[J]. The Journal of Nutrition, 1984, 114(4): 682-691.
- [13] 赵建幸. 蛋白质营养评价新方法的研究: 必需氨基酸相对比值法[J]. 食品工业, 1991(5): 38-40.
- ZHAO Jian-xing. Study on a new method of protein nutrition evaluation: The relative ratio of essential amino acids[J]. The Food Industry, 1991(5): 38-40.
- [14] Food and Agricultural Organization of the United Nations. Amino acid content of foods and biological data on proteins[J]. Nutritional Studies, 1970, 24: 5-6.
- [15] 陈万超, 杨焱, 冯杰, 等. 不同产地商业品种香菇的滋味成分分析及评价[J]. 食品工业科技, 2015, 36(8): 152-157, 166.
- CHEN Wan-chao, YANG Yan, FENG Jie, et al. Analysis and evaluation of flavor components of *lentinus edodes* from different producing areas[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(8): 152-157, 166.
- [16] 周帅, 刘艳芳, 唐庆九, 等. 高效阴离子色谱—脉冲安培检测法分析食用菌中海藻糖、甘露醇和阿糖醇[J]. 食用菌学报, 2011, 18(1): 49-52.
- ZHOU Shuai, LIU Yan-fang, TANG Qing-jiu. Determination of arabinol, trehalose and mannitol in the fruit bodies of edible fungi using high performance anion chromatography-pulsed amperometric detection (HAPEC-PAD)[J]. Acta Edulis Fungi, 2011, 18(1): 49-52.
- [17] 杨华, 孙素玲, 陈维虎, 等. 浙东白鹅与朗德鹅肌肉营养成分比较与评价[J]. 食品与机械, 2020, 36(12): 28-33.
- YANG Hua, SUN Su-ling, CHEN Wei-hu, et al. Comparison and evaluation of muscle nutrition components between East Zhejiang white geese and landes geese[J]. Food & Machinery, 2020, 36(12): 28-33.
- [18] 于海龙, 李玉, 陈万超, 等. 不同品种干制香菇子实体等鲜浓度值差异分析[J]. 食品科学, 2018, 39(4): 171-175.
- YU Hai-long, LI Yu, CHEN Wan-chao, et al. Analysis of differential EUC in dried fruiting bodies of different cultivars of *lentinus edodes*[J]. Food Science, 2018, 39(4): 171-175.
- [19] 任亚倩, 刘鑫, 刘兴建, 等. 以大米为基质培养杏鲍菇的营养成分分析及评价[J]. 食药菌, 2021, 29(2): 157-160.
- REN Ya-qian, LIU Xin, LIU Xing-jian, et al. Analysis and evaluation of nutritional components of *Pleurotus eryngii* cultivated by rice substrate[J]. Edible and Medicinal Mushrooms, 2021, 29(2): 157-160.
- [20] 陈惜燕, 蒲鹏, 康靖全, 等. 8种食用菌游离氨基酸的组成及含量比较[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2017, 45(5): 183-190.
- CHEN Xi-yan, PU Peng, KANG Jing-quan, et al. Comparison of composition and content of free amino acids in eight kinds of edible mushrooms[J]. Journal of Northwest A & F University (Nat Sci Ed), 2017, 45(5): 183-190.
- [21] 谷延泽. 白灵菇与杏鲍菇蛋白质的营养评价[J]. 河南农业, 2010(14): 50-51.
- GU Yan-ze. Nutritional evaluation of protein in *Pleurotus nebroidensis* and *Pleurotus eryngii*[J]. Agriculture of Henan, 2010(14): 50-51.
- [22] 江枝和, 翁伯琦, 林勇. 不同培养料对杏鲍菇子实体蛋白质营养的影响[J]. 西南农业大学学报, 2003(2): 147-149.
- JIANG Zhi-he, WENG Bo-qi, LIN Yong. Effects of different culture media on protein nutrition of *Pleurotus eryngii* fruitbody[J]. Journal of Southwest University (Natural Science Edition), 2003(2): 147-149.
- [23] 曹世宁, 陈相艳, 崔文甲, 等. 食用菌中呈味物质的研究进展[J]. 食品工业, 2016, 37(3): 231-234.
- CAO Shi-ning, CHEN Xiang-yan, CUI Wen-jia, et al. Research progress of flavor substances in edible fungi[J]. The Food Industry, 2016, 37(3): 231-234.
- [24] MAU J L, CHY C, LI J Y, et al. Flavor compounds in straw mushrooms *Volvariella volvacea* harvested at different stages of maturity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45: 4 726-4 729.
- [25] 党晓鹏. 维生素 B₆与畜禽蛋白质代谢[J]. 湖南饲料, 2016(2): 36-38.
- DANG Xiao-peng. Vitamin B₆ and protein metabolism of livestock and poultry[J]. Hunan Feed, 2016(2): 36-38.

(上接第 39 页)

- [31] 潘明芳. 植物乳杆菌 ZDY2013 对小鼠胃肠道微生态的影响及其对幽门螺杆菌感染的预防作用[D]. 南昌: 南昌大学, 2016: 1-2.
- PAN Ming-fang. Modulation of the mice gastrointestinal microbiota by *Lactobacillus plantarum* ZDY 2013 and its preventive effects against *Helicobacter pylori* infection[D]. Nanchang: Nanchang University, 2016: 1-2.
- [32] 华中一, 李洪梅, 孙建辉, 等. 鲜天麻提取物对小鼠肠道菌群结构的影响[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(5): 1 004-1 009.
- HUA Zhong-yi, LI Hong-mei, SUN Jian-hui, et al. Effect of fresh *Gastrodia elata* on gut microbiota in mice[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2019, 44(5): 1 004-1 009.
- [33] 何景江. 荞麦抗性淀粉对肠道菌群影响的研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2017: 18-19.
- HE Jing-jiang. Study on the effect of buckwheat resistant starch on intestinal flora[D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2017: 18-19.