

1735

5-6

螺旋藻制剂调节实验性肠菌群失调症药效学研究[△]

梁冰^{1*}, 吴力克¹, 房芳¹, 姜峰¹, 詹瑛¹, 张学成²

(1. 解放军第四〇一医院, 山东 青岛 266071; 2. 青岛海洋大学 生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要:本研究通过对不同浓度螺旋藻制剂进行药效学试验,验证其调节实验性肠菌群失调症、治疗抗生素相关性腹泻的效果。结果表明:1)治疗前各组 100% 出现中、重度腹泻;治疗后第 6 天,转为正常——轻度腹泻者,高剂量组和中剂量为 100%,低剂量组为 80%。2)菌群分析结果显示,螺旋藻低剂量组双歧杆菌和肠肝菌数量水平早期均显著高于两对照组($P < 0.05$),中剂量和高剂量组生理菌数量增加水平基本相同;较自然恢复组增加非常显著($P < 0.01$),较生理盐水组增加显著或非常显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。实验提示,螺旋藻可显著缓解肠菌群失调症模型小鼠的腹泻症状,但有一定剂量依赖性。中剂量和高剂量均可迅速缓解模型小鼠腹泻症状,纠正其肠道菌群紊乱,两者间的治疗效果无显著差别。

关键词:SPF-BA1B/C 小鼠;肠菌群失调症;螺旋藻

中图分类号:R931.711 文献标识码:A 文章编号:1002-3461(2002)01-0029-05

Determination of pharmacodynamics of *spirulina* on the experimental imbalance of mouse intestinal bacterial flora

Liang Bing, Wu Li-ke, Fang fang, *et al.*

(Hospital 401 of the PLA, Qingdao 266071, China)

Abstract: The goal of this study is that determining pharmacodynamics on the experimental imbalance of mouse intestinal bacterial flora and the curing efficiency of antibiotic related diarrhea of *Spirulina* by assaying its pharmacodynamics at different concentrations. This experimental results have showed that: 1) All modeled mice performed diarrhea at middle or severe before therapy. And after treating all mice of middle and high *Spirulina* dosage treating groups and 80% of low *Spirulina* dosage treating group performed diarrhea at mild. 2) The number of *Enterobacter* and *Bifidobacterium* of low dosage *Spirulina* curing group was higher significantly than that of two controls ($P < 0.05$) at the early stage. The number of 5 types of intestinal bacterial flora of high *Spirulina* dosage group was similar to that of middle dosage group, which was significantly higher than that of naturally restoring group ($P < 0.01$) and physiological saline group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Therefore, we hold that *Spirulina* can attenuate diarrhea symptoms of mouse intestinal bacterial flora imbalance model, yet depending on dosage used. Middle and high *Spirulina* dosages can mitigate the symptoms of mouse diarrhea quickly, setting their intestinal bacterial flora in correct order. However, the middle and high dosages have similar contributions.

Key words: SPF-BA1B/C mouse; Imbalance of intestinal bacterial flora; *Spirulina* sp.

[△] 基金项目: 中国、三军解放军九五医学规划课题基金资助面上项目(编号 96D053)

* 通讯联系人: 青岛海洋大学 266003

螺旋藻被称为最理想的健康食品之一^[1]。大量资料表明,其对人体有多方面的有益作用^[2,3]。我们曾在体外实验中证实,螺旋藻对肠道最主要的益生菌——双歧杆菌和乳杆菌均有明显增殖作用^[4]。为验证其是否能够应用于调整肠道菌群紊乱,治疗腹泻,我们制备了小鼠肠菌群失调症模型,对不同浓度的螺旋藻制剂进行了药效学试验。

1 材料与方法

1.1 药物 螺旋藻:钝顶螺旋藻超微粉剂由青岛海洋大学生命学院提供(藻种源自山东富施特海洋生物工程公司)。用无菌生理盐水,配成 0.84、1.67、3.34 g·L⁻¹ 3 种浓度的螺旋藻悬液;氨苄青霉素:山东鲁抗医药集团鲁源有限公司生产,批号 L000140。

1.2 培养基 TPY 琼脂培养基:为双歧杆菌选择性培养基;MRS 琼脂培养基:为乳酸杆菌选择性培养基;EC 琼脂培养基:为肠球菌选择性培养基;MacConKy 琼脂培养基:为肠杆菌选择性培养基;AN 琼脂培养基:为类杆菌选择性培养基。

1.3 实验动物

SPF-BALB/C 小鼠共 100 只,体重 18~22 g,均为雄性,中国医学科学院肿瘤医院实验动物中心提供,实验动物许可证号为京动许字(1999)第 015 号。

1.4 肠菌群失调症动物模型制作

所购动物在标准条件下经一周适应性饲养后,与实验前禁食 6h(自由饮水)。肠菌群失调症造模氨苄青霉素浓度为 22.4 g·kg⁻¹ 体重。按此浓度将氨苄青霉素溶于无菌生理盐水,每天每只 0.5mL 给小鼠灌胃 2 次,连续 3d。灌胃后立即观察用药反应 2~3 min。以后每 12h 进行一次观察记录。第 1 次灌服后 12h 内,所有模型小鼠均出现水样稀便,灌药结束后至治疗后第 2 天,少量实验小鼠因严重腹泻死亡(5%)。

1.5 实验小鼠分组

正常对照组:共 10 只小鼠,作正常健康小鼠菌群分析。

造型组:共 10 只小鼠,用氨苄青霉素造模(肠菌群失调症模型)成功后,立即进行肠菌群分析,并与正常健康小鼠对照,验证模型是否建立。

高剂量组:共 16 只小鼠,用 3.34 g·L⁻¹ 浓度螺旋藻悬液治疗。每只小鼠每次口服灌胃 0.5mL,每天 2 次,连续 4d,观察至第 6 天。

中剂量组:共 16 只小鼠,用 1.67 g·L⁻¹ 浓度螺旋藻悬液治疗。每只小鼠每次口服灌胃 0.5mL,每天 2 次,连续 4d,观察至第 6 天。

低剂量组:共 16 只小鼠,用 0.84 g·L⁻¹ 浓度螺旋藻悬液治疗。每只小鼠每次口服灌胃 0.5mL。每天 2 次,连续 4d,观察至第 6 天。

生理盐水对照组:共 16 只小鼠,每只小鼠每次口服灌胃生理盐水 0.5mL,每天 2 次,连续 4d,观察至第 6 天。

自然恢复组:共 16 只小鼠,用氨苄青霉素造模成功后,不作治疗处理,连续观察 6d。

1.6 模型小鼠腹泻程度判定

重度:水样便、不成型、几无粪质。每天超过 40 次;中度:稀软便、不成型、少量粪质、带粘液和脓,每天超过 30 次;轻度:颗粒状粪便,膨大松软,偶见脓头,每天 20 次;正常:健康小鼠粪便颗粒,每天 10~20 次。

1.7 实验小鼠肠道菌群检查

1.7.1 标本留取时间

正常对照组于适应性饲养结束后一次性留取新鲜大便进行菌群分析;造型组于造模成功后第 2 小时留取大便行菌群分析;各浓度螺旋藻治疗组于治疗后第 2 天、第 4 天、第 6 天分别 3 次留取新鲜粪便;生理盐水对照组和自然恢复组大便留取时间同螺旋藻治疗组。

1.7.2 标本处理及接种

每份新鲜标本均尽快移入已称重的无菌玻璃试管中,立即密封管口带回实验室,置厌氧手套箱中逐一称重,连续 10 倍倍比稀释至

10⁻⁵(1:1000000)稀释液。取各稀液度供试液均 10μL,滴加接种于 TPY、MRS、EC、MacConKy 及 AN 琼脂平皿上。

1.7.3 细菌培养及计数

将 TPY、AN、MRS 培养基留置厌氧手套箱培养,35℃,48h;EC、MacConky 琼脂培养基置 37℃,普通培养 24h;培养结束后,分别计数每一稀释度 TPY、AN、MRS、EC、MacConky 琼脂平板表面生长的细菌菌落数。

1.8 统计学处理

每毫升菌液中活菌数计算:细菌菌落数×稀释倍数×100=CFU/ML(Colon form unit),结果换算成以 10 为底的对数值,用两几何均数相比较的 t 检验算出 P 值,数据处理用 spss 软件在计算机上进行。

2 结果

2.1 各组小鼠腹泻症状恢复情况比较见表 1。

表 1 各组小鼠腹泻症状恢复情况

组别	治疗前 1h				疗后第 2 天				疗后第 4 天				疗后第 6 天			
	重	中	轻	正常	重	中	轻	正常	重	中	轻	正常	重	中	轻	正常
自然恢复组	15/16	1/16	0/16	0/16	12/14	2/14	0/14	0/14	4/14	5/14	3/14	2/14	0/14	5/14	6/14	3/14
生理盐水对照组	16/16	0/16	0/16	0/16	10/14	3/14	1/14	0/14	3/14	5/14	3/14	3/14	0/14	4/14	7/14	3/14
低剂量组	16/16	0/16	0/16	0/16	7/15	6/15	2/15	0/15	4/15	4/15	3/15	4/15	0/15	3/15	6/15	6/15
中剂量组	15/16	1/16	0/16	0/16	5/16	6/16	3/16	2/16	2/16	2/16	5/16	7/16	0/16	0/16	2/16	14/16
高剂量组	16/16	0/16	0/16	0/16	4/16	5/16	3/16	4/16	1/16	2/16	6/16	7/16	0/16	0/16	2/16	14/16

注:表中分母为小鼠数,分子为某腹泻状态小鼠数。

由表 1 所示,治疗前各组 100%出现中重度腹泻,治疗后第 2 天,各治疗组半数以上腹泻由重度转为中-轻度,而生理盐水和自然恢复组分别有 86%和 71%继续水样便腹泻;治疗后第 4 天,重度腹泻小鼠高剂量组仅为 6.3%,中剂量组为 12.5%,低剂量组为 26.7%,生理盐水对照组和自然恢复组分别为 21.4%和 28.5%;治疗后第 6 天,各组均

无重度腹泻小鼠,轻度腹泻-正常者,高剂量组和中剂量组均为 100%,低剂量组为 80%。生理盐水对照组和自然恢复组分别为 71.4%和 64.3%,观察治疗过程中,低剂量组有 1 只小鼠死亡,生理盐水对照组和自然恢复组各有 2 只小鼠死亡。

2.2 正常健康和造模组小鼠肠道菌群比较分析(见表 2)。

表 2 正常健康和造模组小鼠肠道菌群均值比较(±s)

组别	肠道正常菌群均值数					
	n	肠杆菌	肠球菌	双歧杆菌	乳杆菌	类杆菌
正常健康组	10	7.08±1.30	9.35±0.68	10.1±0.77	9.29±0.82	10.47±2.04
造模组	10	1.99±0.71***	-	-	2.75±0.23***	-

注:*** P<0.001 vs 健康组;-指造模组小鼠新鲜粪便中未检测到该菌。

由表 2 可见,与正常健康组比较,氨基青霉素诱导肠菌群失调症造模组小鼠正常菌群数量剧降,其中肠球菌、双歧杆菌、类杆菌缺如(培养无菌生长),肠杆菌和乳杆菌则减少

非常显著(均 P<0.001)。

2.3 疗后第 2、4、6 天各组小鼠肠道菌群比较分析分别见表 3、表 4、表 5。

表 3 疗后第 2 天各组小鼠肠道菌群均值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	肠道正常菌群均值数					
	n	肠杆菌	肠球菌	双歧杆菌	乳杆菌	类杆菌
自然恢复组	14	2.06±0.02	1.81±0.11	3.06±0.18	3.15±0.40	2.27±0.06
生理盐水对照组	14	2.75±0.10	2.03±0.19	3.11±0.13	3.53±0.27	2.71±0.18
低剂量组	15	3.96±0.45 ^{*△}	2.98±0.32 [*]	3.97±0.20 [△]	3.99±0.78 [*]	3.22±0.35 [*]
中剂量组	16	4.77±0.09 ^{**△△}	4.25±0.77 ^{**△}	5.03±0.52 ^{**△△}	4.64±0.45 ^{**△}	4.29±0.83 ^{**△△}
高剂量组	16	4.80±0.16 ^{**△△}	4.59±1.30 ^{**△}	5.64±0.23 ^{**△△}	4.95±0.66 ^{**△}	4.01±0.34 ^{**△}

表 4 疗后第 4 天各组小鼠肠道菌群均值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	肠道正常菌群均值数					
	n	肠杆菌	肠球菌	双歧杆菌	乳杆菌	类杆菌
自然恢复组	14	4.11±1.68	4.08±1.03	7.03±0.88	7.13±0.89	6.10±0.52
生理盐水对照组	14	4.38±1.73	5.16±1.07	7.74±0.97	7.59±1.06	6.47±1.82
低剂量组	15	6.04±1.91 ^{*△}	6.59±1.15 ^{*△}	8.41±0.58 [*]	7.87±0.83	7.77±0.96 ^{*△}
中剂量组	16	7.92±1.15 ^{**△△}	8.19±1.01 ^{**△△}	10.12±0.83 ^{**△△}	9.91±0.31 ^{**△}	9.53±1.06 ^{**△△}
高剂量组	16	8.07±1.22 ^{**△△}	8.97±2.04 ^{**△△}	9.42±0.86 ^{**△}	10.05±0.95 ^{**△}	10.44±0.79 ^{**△△}

表 5 疗后第 6 天各组小鼠肠道菌群均值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	肠道正常菌群均值数					
	n	肠杆菌	肠球菌	双歧杆菌	乳杆菌	类杆菌
自然恢复组	14	5.93±1.12	6.55±1.96	7.87±0.70	8.07±0.36	8.04±0.94
生理盐水对照组	14	6.89±0.87	6.69±0.81	8.24±1.49	8.28±0.65	8.52±0.40
低剂量组	15	7.06±0.96 [*]	7.25±0.82	8.94±0.82 [*]	8.33±0.71	8.96±1.30
中剂量组	16	8.48±2.32 ^{**△}	9.55±0.78 ^{**△}	11.23±0.91 ^{**△△}	10.44±0.59 ^{**△}	11.02±0.63 ^{**△}
高剂量组	16	8.76±2.19 ^{**△}	10.25±0.63 ^{**△△}	10.42±0.75 ^{**△}	10.68±0.81 ^{**△}	11.27±0.32 ^{**△△}

注: * $P < 0.05$ 和 ** $P < 0.01$ 不同剂量组 vs 自然恢复组; [△] $P < 0.05$ 和 ^{△△} $P < 0.01$ 不同剂量组 vs 生理盐水组, 以上各表意义相同。

3 讨论

螺旋藻作为保健食品已有悠久历史^[1]。尤其近半个世纪以来,对其功效及其机理的研究也取得了很大进展^[5,6]。但从微生态学角度对螺旋藻进行研究,则罕有报道。我们曾用体外实验证实,螺旋藻对 6 株肠源性双歧杆菌和 3 株乳杆菌均有增殖作用^[4]。已知高水平的双歧杆菌和乳杆菌能够有效阻止病原体和其他致病因素对肠道的致病作用^[7],据此推测螺旋藻能够在肠道作为一种生长促进因子,促进生理性细菌的增殖、抑制致病因子、改善肠道微环境,达到维护肠道微生态平衡的目的。为验证这一设想,我们在本研究中配备了小鼠肠菌群失调症模型^[8],用以考察螺旋藻对肠菌群失调的调整(治疗)作用。大量微生态学研究资料证实,腹泻虽多能找到其外来因素,但本质原因是肠道正常菌群失调,

肠菌群由生理性组合变成病理性组合,丧失了对外因的屏障作用所致。本文用大剂量氨基青霉素灌服小鼠,造成严重腹泻后,以健康小鼠为对照,对腹泻小鼠 5 种肠道主导优势菌群(肠杆菌、肠球菌、双歧杆菌、乳杆菌、类杆菌)进行比较分析,为客观验证螺旋藻纠正肠菌群失调症,治疗腹泻的效果,本文以造模小鼠自然恢复及灌服生理盐水为对照,并以富施特螺旋藻成人推荐剂量为参考,倍比配制了低、中、高 3 种浓度螺旋藻悬液,除观察其对腹泻症状的缓解效果外,重点在造模小鼠治疗后第 2、4、6 天,定量分析了肠道正常菌群的增殖状态。研究结果表明:1)自然恢复组造模成功后第 2 天,5 种肠道正常生理菌的数量水平有所回升,但仍明显低于正常水平;第 4 天,5 种细菌的数量有较大幅度增加,其中以双歧杆菌、乳杆菌增加最为明显;

第 6 天, 5 种生理菌的数量又有明显增加, 但较正常健康小鼠肠道生理菌水平仍普遍偏低。结果提示, 大剂量氨基青霉素造成的肠菌群失调性腹泻有自愈倾向, 即在无治疗因素影响下, 腹泻症状可缓慢消失, 肠道菌群的平衡状态可在一定时间内逐渐恢复; 2) 生理盐水组口服灌胃后第 2 天、第 4 天、第 6 天肠道正常菌群定量分析, 5 种生理菌数量均略高于自然恢复组, 但无显著性差异。该结果提示生理盐水对抗生素性腹泻无明确治疗作用, 对肠道菌群平衡状态的恢复无显著影响; 3) 螺旋藻低剂量组疗后第 2 天, 5 种生理菌数量均显著高于自然恢复组和/或生理盐水组 ($P < 0.05$); 治疗后第 4 天, 肠杆菌、肠球菌及类杆菌数量水平显著高于两对照组 ($P < 0.05$), 双歧杆菌仅显著高于自然恢复组, 乳杆菌则与两对照组无显著差异; 治疗后第 6 天, 仅肠杆菌和双歧杆菌的增加水平有显著性 ($P < 0.05$), 其它 3 种菌的增加水平与同期两对照组无显著性差异。提示低剂量螺旋藻对小鼠肠菌群失调的早期调整作用明显, 后期则逐渐不明显; 4) 螺旋藻中剂量组疗后第 2 天、第 4 天、第 6 天, 5 种生理菌数量较周期自然恢复组增加均非常显著 ($P < 0.01$), 较生理盐水增加显著或非常显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。该结果提示中剂量螺旋藻对有益生理菌的增殖作用突出, 可明显缩短腹泻症状和肠菌群平衡失调的持续时间; 5) 螺旋藻高剂量组疗后第 2 天、第 4 天、第 6 天, 5 种生理菌数量增加水平与中剂量组很接近, 即较同期自然恢复组增加非常显著 ($P < 0.01$), 较生理盐水组增加显著或非常显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。提示高剂量螺旋藻纠正腹泻和肠菌群失调的效果与中剂量组并无差别, 表明适当的剂量是影响螺旋藻抗腹泻和整肠效果的一个重要因素(以上详见表 3、表 4、表 5)。总之, 本文从症状学和微生物学角度均证明, 螺旋藻可能会有调节

肠道内环境的益生原复合物, 与 Kay RA 的报道相符^[9]。值得注意的是, 我们曾在体外实验证实, 螺旋藻仅对双歧杆菌、乳杆菌的增殖有促进作用, 而对肠杆菌、肠球菌、类杆菌并无明显促增殖作用。但在本文菌群定量分析中, 发现模型小鼠肠道内 5 种生理性细菌均在螺旋藻用药后有显著或非常显著增加, 提示肠道内最主要优势菌群双歧杆菌和乳杆菌的增殖, 对其它生理菌的增殖有带动作用, 详细机理及意义有待探讨。另一方面, 尽管本文用体内试验证实了螺旋藻在调整肠道内菌群、改善肠道微环境、刺激生理性有益菌增殖、纠正肠道菌群紊乱、缓解腹泻症状有明确的正向调节作用, 从微生物学的观点, 证明了其作为一种生理性细菌生长促进因子的应用价值, 但由于螺旋藻是一种成份复杂的藻类生物, 其作为微生态调节剂的真正有效成分尚待进一步明确, 机理亦有待阐明, 这将是我们的下一步的研究目标。

参考文献

- [1] Ambha Belay, Yoshimichi Ota, Kaznyuki Miya Kawa. Current Knowledge on potential health benefits of Spirulina[J]. *Journal of Applied Phycology*, 1993, (5): 235.
- [2] Annapurna VVO, Deosthale YG, Bamji MS. Spirulina as a source of Vitamin A[J]. *Plant Foods Hum Nutr*, 1991, 41(2):125.
- [3] Dillon JC, Phuc AP, Dubacq JP. Nutritional value of the alga Spirulina[J]. *World Rev Nutr Diet*, 1995, 77:32.
- [4] 梁冰, 吴力克, 张学成. 螺旋藻在体外对肠道菌群增殖的促进作用[J]. *中国海洋药物杂志*, 1999, 18(3):7.
- [5] Schwastz J, Shklar G, Reid S, et al. Prevention of experimental oral cancer by extracts of spirulina-Dunaliella algae[J]. *Nutr Cancer*, 1988, 11(2):127.
- [6] Gonzalez E, Rivera C, Miranda Zamora R, et al. Preventive effect of Spirulina maxima on the fatty liver induced by a fructose-rich diet in the rat a preliminary report[J]. *Life Sci*, 1993, 53(1):57.
- [7] 魏容, 张德纯. 双歧杆菌对改善胃肠道功能的研究现状与展望[J]. *中国微生态学杂志*, 1999, 11(4):256.
- [8] 熊德鑫. 现代微生态学[M]. 北京: 北京中国科学技术出版社, 2000. 129.
- [9] Kay Ra. Microalgae as food and supplement Food[J]. *Sci Nutr*, 1991, 30(6):555.

(收稿日期: 2001-06-21)