

白矾对小鼠肠道微生态平衡的影响*

严梅桢 叶文华 宋红月 张粒民 伍迎红 周钟鸣

内容提要 目的:了解由白矾引起的小鼠肠道微生态平衡失调的程度和细菌对该小鼠肠道粘膜的粘附性。方法:用白矾 0.25g/kg 和 1g/kg 两个剂量喂饲小鼠 8 周再停药恢复 5 周,分别对小鼠肠道菌群进行分析,并测定试验菌对小鼠肠道粘膜上皮细胞表面的粘附性。结果:小鼠喂饲白矾 8 周后,肠道中生理性细菌双歧杆菌和乳杆菌数量明显下降,大肠杆菌菌量显著上升。双歧杆菌对小鼠肠道粘膜的粘附率明显低于对照组小鼠,大肠杆菌则相反。停药恢复 5 周后,小鼠紊乱的肠道菌群和两种试验菌对小鼠肠道粘膜的粘附率均基本恢复正常。结论:小鼠长期服用白矾引起的肠道菌群的失调只是一种暂时的菌量变化,消除作用因素后,经停药恢复 5 周,紊乱的菌群状态和细菌对小鼠肠道的粘附率均可自行恢复至正常。

关键词 白矾 肠道菌群 微生态平衡 粘附

Effect of Alum on Intestinal Microecological Balance in Mice Yan Meizhen, Ye Wenhua, Song Hongyue, et al
Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing (100700)

Objective: To observe the degree of microecological imbalance induced by alum in normal intestine of mice, and the bacterial adherence activity in the intestine of the mice administered orally with alum. **Methods:** The mice were medicated orally with alum of small and large doses (0.25g/kg and 1g/kg) for 8 weeks, then 5 weeks after stopping administration of alum, microflora analysis and bacterial adherence to intestinal mucosal epithelial cells were carried out respectively. **Results:** Eight weeks after administration with alum, the counts of Bifidobacteria and Lactobacilli decreased significantly, but the numbers of pathogenetic E. Coli increased significantly. The adherence rate of Bifidobacteria to the enterocytes of mice reduced markedly, but E. Coli was on the contrary of Bifidobacteria. Five weeks after the ceasing of medication, the intestinal flora were balanced, the adherence rate of both strains as mentioned above recovered to normal level. **Conclusion:** The imbalance of intestinal flora of mice administered with alum for a long time were only the transient change of bacterial counts. The imbalance of intestinal flora and the adherence rate of bacteria regained normal status five weeks after cancelling action factor.

Key words alum, intestinal flora, microecological balance, adherence

目前正常细菌尤其肠道菌群与机体的关系越来越引起人们的关注。肠道菌群与机体有着密切的关系,与机体保持着正常的生理平衡状态,一旦这种生态平衡受到破坏,就有可能导致机体疾病的产生。而且对宿主的营养、代谢、免疫及消化道疾病甚至肿瘤的发生等都有一定的影响。

白矾的化学成分是硫酸铝钾,某些用白矾炮制的中药也含有不同量的铝。铝的蓄积对中枢神经系统的影响尤为显著,1973 年 Crapper 氏等发现,老年性痴呆患者大脑含铝水平明显升高,约为正常人的 10~30

倍⁽¹⁾,故推测本病与铝中毒有关。铝以肠道摄取为主,我们已发现长期服用白矾能引起小鼠肠道菌群的紊乱⁽²⁾,为了解菌群失调的程度,将小鼠喂饲白矾 8 周停药恢复 5 周,在这两个时间内分析其肠道菌群状态及细菌对肠粘膜的粘附。

材料和方法

1 动物 NIH 健康小鼠由北京市生物制品研究所动物室提供。体重 18~22g,雌雄各半。

2 药物 白矾(Alumen)购自北京同仁堂东城批发站,经吴连英教授鉴定。根据实际测得每只小鼠每日饮水量和体重,配制成一定浓度的白矾水溶液,动物自由饮用,随小鼠体重的增加,随时调整药物浓度。

3 培养基 分别用伊红美蓝培养基(北京市海淀

*国家自然科学基金资助项目(No. 39470857)

中国中医研究院中药研究所(北京 100700)

区微生物培养基制品厂产品)和肠球菌选择培养基(本单位实验室自配)分离大肠杆菌和肠球菌。BF 和 LA 培养基(购自北京市明新生物技术研究所在)分别分离双歧杆菌和乳杆菌。分离拟杆菌用的 BA 血平板由本实验室自配。胰酶消化大豆胨肉汤(TSB)为英国 OXOID 产品, GAM 培养基购自北京市明新生物技术研究所在, 营养琼脂为上海市医学化验所试剂厂产品。

4 菌株 双歧杆菌 *B. adolescentis* 由富山医科大学惠赠。大肠杆菌 *E. coli* 由北京医科大学第一医院细菌室提供并鉴定。

5 分组及给药 取小鼠按体重随机分为 3 组: 对照组(简称 A 组)、白矾小剂量组(简称 B 组, 0.25g/kg, 相当于人用量的 10 倍)及白矾大剂量组(简称 C 组, 1g/kg, 相当于人用量的 40 倍)。

6 口服白矾小鼠肠道菌群的分析 小鼠喂饲白矾 8 周时, 各组取一半小鼠进行肠道菌群分析, 剩余的动物经停药恢复 5 周后再进行肠道菌群分析。将小鼠处死无菌取出盲肠内容物, 置于无菌试管内, 加入 10 倍于粪便重量的 0.05% 酵母稀释液, 使其浓度为 10^{-1} , 然后将试管置于振荡器上充分振荡成粪便悬液, 再用稀释液将粪便依次进行 10 倍稀释至 10^{-7} , 各类细菌的接种与培养按本实验室常规进行⁽³⁾。滴种有各种菌的平板经培养后, 计数各平板上的菌落数, 计算出每克粪便中该菌的数量。结果以每克粪便中的菌数的对数(log N/g)表示, 并对计算的结果用 *t* 检验进行统计分析。

7 细菌粘附率的测定 将健康小鼠分成对照组和给药组(剂量为 0.25g/kg)。小鼠喂饲白矾 8 周时, 各组取一半小鼠, 测定试验菌对小鼠肠粘膜上皮细胞的粘附率, 剩余动物停药恢复 5 周后再进行粘附率的测定。

7.1 细菌培养 试验前将双歧杆菌接入 GAM 肉汤液中, 置于厌氧箱内 37℃ 培养 24h。大肠杆菌接种于 TSB 培养液内, 置于培养箱内 37℃ 培养 24h。第 2 天分别将以上两种试验菌的肉汤培养物经离心沉淀弃去上清液, 用 PBS 将沉淀物洗涤 3 次, 最后将细菌悬浮于 PBS 中, 使其浓度为 1×10^8 CFU/ml, 以供细菌粘附用。

7.2 小鼠肠细胞的制备 参照文献⁽⁴⁾方法, 处死小鼠取出肠子并去除肠系膜和脂肪, 将肠子纵向剪开, 用生理盐水将肠洗净, 用 EDTA 在 37℃ 水浴内振荡消化, 反复处理, 合并几次消化所得的细胞悬液, 以 800r/min 离心 10min, 弃去上清液, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 最后将细胞悬浮于 PBS 中, 配制成每毫升含 $1 \times$

10^5 细胞悬液。

7.3 细菌粘附试验 细胞悬液和等体积细菌悬液混合, 将混合液立即置于冰水中, 同时取出一部分混合液, 经滤孔为 5μm 的滤器过滤后得滤液 A' 置于冰水中, 剩余的混合液在室温放置 1h 后, 同上方法过滤得滤液 B', 用 0.05% 酵母液对 A' 液和 B' 液进行 10 倍稀释, 大肠杆菌接种在 EMB 培养基上, 将 EMB 平板置于 37℃ 培养箱内培养 24h, 双歧杆菌滴种于 GAM 血平板上, 置于厌氧箱内 37℃ 培养 48h。培养后分别计算 A' 液和 B' 液单位体积中的细菌数, A' 液和 B' 液细菌数之差即为粘附于肠粘膜上皮细胞表面的细菌数, 计算出试验菌粘附于每鼠上皮细胞的粘附率 $[(A' - B')/A' \times 100\%]$, 并用 *t* 检验进行统计分析。

结 果

1 白矾对小鼠肠道菌群的影响 见表 1。小鼠喂饲白矾大、小剂量 8 周, 肠道内大肠杆菌和肠球菌菌量明显升高, 而双歧杆菌数量显著下降。小剂量白矾对拟杆菌和乳杆菌数量没有影响, 但大剂量白矾使肠道内乳杆菌和拟杆菌菌量显著下降。结果表明, 小鼠长期服用白矾能引起肠道微生态平衡失调。

表 1 白矾对小鼠肠道菌群的影响 (log N/g, $\bar{x} \pm s$)

组别	双歧杆菌	乳杆菌	拟杆菌	肠球菌	大肠杆菌
A	9.47 ± 0.29	9.37 ± 0.29	9.37 ± 0.69	6.05 ± 0.63	5.27 ± 1.08
B	8.57 ± 0.93**	8.88 ± 0.74	8.23 ± 1.81	6.84 ± 0.98*	7.06 ± 1.34**
C	8.80 ± 0.63**	8.79 ± 0.77*	8.37 ± 1.17*	6.89 ± 0.56**	7.85 ± 1.02***

注: 与 A 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 各组鼠数为 10

2 白矾对小鼠停药恢复 5 周后肠道菌群的影响 用药组小鼠肠道内厌氧菌双歧杆菌、乳杆菌和拟杆菌, 需氧菌大肠杆菌及肠球菌, 它们的菌量与对照组小鼠无明显差别。结果表明, 服用白矾引起小鼠肠道菌群紊乱的状态经停药恢复一定时间后, 其菌群失调状态基本恢复正常。

表 2 停药恢复 5 周后小鼠肠道菌群的变化 (log N/g, $\bar{x} \pm s$)

组别	双歧杆菌	乳杆菌	拟杆菌	肠球菌	大肠杆菌
A	9.05 ± 0.46 (8)	9.47 ± 0.37 (8)	9.19 ± 1.15 (8)	6.14 ± 0.81 (8)	5.61 ± 1.16 (8)
B	9.37 ± 0.89 (10)	9.51 ± 0.48 (10)	9.00 ± 1.12 (10)	6.39 ± 0.49 (10)	6.34 ± 0.63 (10)
C	9.12 ± 0.99 (7)	9.36 ± 0.62 (7)	9.23 ± 1.17 (7)	6.56 ± 1.07 (7)	6.49 ± 1.23 (7)

注: () 内为鼠数

3 白矾对小鼠肠道粘膜上皮细胞粘附率的影响 见表 3。双歧杆菌对正常小鼠肠道粘膜上皮细胞粘附率明显高于大肠杆菌, 经长期服用白矾后小鼠肠道内

双歧杆菌对其肠道粘附率明显低于大肠杆菌;而且双歧杆菌对服用白矾小鼠肠道的粘附率明显低于对正常小鼠肠道粘膜的粘附率,大肠杆菌则相反。

表 3 白矾对小鼠肠道粘膜上皮细胞粘附率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	粘附率	
		双歧杆菌	大肠杆菌
对照	10	52.07 $\pm$ 13.29 [△]	38.03 $\pm$ 9.23
白矾	10	35.86 $\pm$ 14.36 * [△]	57.49 $\pm$ 9.82 **

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与本组大肠杆菌比较, [△] $P < 0.01$

4 白矾对停药恢复 5 周的小鼠肠道粘膜的粘附率的测定 见表 4。双歧杆菌对喂饲白矾 8 周停药恢复 5 周的小鼠肠道粘附率与对照组小鼠比较,无显著性差异,大肠杆菌粘附情况同双歧杆菌。表明小鼠经停药恢复后,双歧杆菌和大肠杆菌对小鼠肠道粘膜上皮细胞粘附率均已基本恢复正常。

表 4 白矾对停药恢复 5 周小鼠肠道粘膜上皮细胞粘附率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	粘附率	
	双歧杆菌	大肠杆菌
对照	56.50 $\pm$ 11.85(8) [△]	35.10 $\pm$ 10.06(8)
白矾	60.84 $\pm$ 13.31(9) [△]	42.34 $\pm$ 10.83(8)

注:与本组大肠杆菌比较, [△] $P < 0.01$; () 内为鼠数

讨 论

在正常人体和动物肠道内栖居大量细菌,其中厌氧菌为优势菌群,需氧菌所占比例甚至不到 1%。机体与正常菌群保持着一种生态平衡,而且正常菌群之间也保持着恒定的比例关系,菌群失调是正常菌群生态平衡紊乱的一种表现,肠道内常住菌在数量上的比例失调是菌群失调表现之一,比例失调可分三度⁽⁵⁾:第一度和第二度菌群失调都是或主要是量的改变,一度菌群失调是暂时的,可以恢复的。二度是不可逆的,由于正常菌在数量上的持续改变所致。三度是菌交替症状态,正常菌的位置被外袭菌占据。结果表明,白矾在所用剂量下引起的菌量上的比例失调属于一度菌群失调。但如果长期摄入铝,使肠道内正常菌在数量上持续改变,就有可能造成二度菌群失调,导致机体疾病的产生,故应引起人们的注意,重视铝对人体的危害。

肠道中占优势的双歧杆菌和乳杆菌与人体生理活动关系最为密切,肠道微生态平衡的维持主要依赖于

肠道优势菌的作用。实验研究已证实,在实验性脾虚动物、衰老动物、痴呆动物肠道中双歧杆菌数量明显下降^(3,6,7),表明机体处于各种病理状态时,该菌数量大多往往表现出下降,特别是胃肠道的疾患,可以认为双歧杆菌的减少是一些疾病可能发生的信号。由于双歧杆菌数量减少,其在宿主肠粘膜表面形成屏障作用的减弱,而导致病菌和条件致病菌的定植和入侵。粘附试验的结果也证实在长期服用白矾的小鼠肠道内,双歧杆菌对小鼠肠粘膜粘附率明显低于大肠杆菌。由此表明稳定的微生态平衡对机体的健康起着十分重要的作用。而细菌的粘附是它在肠道定植的第一步,在保持微生态稳定的平衡上起重要作用。另外有实验发现,小鼠长期服用大剂量白矾时,脑内胆碱乙酰基转移酶和乙酰胆碱含量明显下降,同时出现学习、记忆障碍⁽⁸⁾,已证实老年性痴呆患者具有特异性的胆碱乙酰基转移酶活性减低⁽⁹⁾。提示白矾、老年痴呆和肠道菌群之间可能存在有一定关系,有待于进一步研究。

参 考 文 献

1. 徐经采. 微量元素与衰老. 微量元素 1985; (1~2): 85—89.
2. 严梅桢, 宋红月, 张粒民, 等. 白矾对小鼠肠道菌群的影响. 中国中药杂志 1998; 23(12): 743—745.
3. 严梅桢, 李志年, 谢念祥, 等. 四君子汤对实验性脾虚小鼠肠道菌群的影响. 中国微生态学杂志 1989; 1(1): 40—42.
4. Liu Linxing, Namba Tauneo, Zhao Chunju, et al. Effects of traditional medicines on the adherence of intestinal bacteria to rat enterocytes. 和汉医药学会志 1992; 9(3): 190—194.
5. 康 白主编. 微生态学. 大连: 大连出版社, 1988: 122—123.
6. 严梅桢, 宋红月, 谢念祥, 等. 衰老动物肠道菌群的变化及黄芪的拮抗作用. 中国中药杂志 1995; 20(10): 624—626.
7. 严梅桢, 宋红月, 叶文华, 等. 实验性痴呆动物的肠道菌群和粘附性研究. 中国微生态学杂志 1998; 10(6): 327—329.
8. Wu Yinghong, Zhou Zhongming, Xiong Yulan, et al. Effect of aluminum potassium sulfate on learning, memory and cholinergic system in mice. Acta Pharmacologica Sinica 1998; 19(6): 509—512.
9. Carl GG, Tamas B, Arrid C, et al. Multiple biochemical deficits in both grey and white matter of alzheimer disease brains. Prog. Neuropsychopharm and Biol Psychiat 1986; 10: 405—413.

(收稿: 1999-01-20 修回: 1999-05-30)