

基于肠道微生态研究黄芪超微粉饮片的抗疲劳作用

白雪松^a, 刘鹤^a, 宋岩^b, 律广富^c, 林贺^a, 林喆^a, 李银清^{a*} (长春中医药大学, a.药学院, b.临床学院, c.人参科学研究院, 长春 130117)

摘要: 目的 观察黄芪超微粉饮片对 C57BL/6 小鼠的抗疲劳作用及肠道菌群变化。方法 将 C57BL/6 小鼠分为黄芪超微粉高剂量组(2.50 g·kg⁻¹)、中剂量组(1.25 g·kg⁻¹)、低剂量组(0.63 g·kg⁻¹)、传统饮片组(2.5 g·kg⁻¹)、传统粉末组(2.5 g·kg⁻¹)和空白组。连续灌胃给药 30 d, 期间和给药后测定小鼠体质量、行为学指标和生化指标。在灌喂第 30 天时无菌取结肠内容物, 提取 DNA, 扩增肠道菌群 16S rDNA 基因的 V3+V4 区, 采用高通量测序分析 β 多样性和 α 多样性、分析门水平和属水平的物种组成。结果 与空白组比较, 黄芪超微粉饮片高剂量组小鼠的爬杆时间、转棒距离与跑步距离均延长, 分别为 14.8%($P<0.05$)、26.8%($P<0.01$)和 16.2%($P<0.01$); 小鼠肝糖原和骨骼肌 ATP 均升高, 分别为 20.48%和 20.86%($P<0.01$)。血清中的 BUN 和 LA 的含量下降了 5.87%($P<0.01$)和 12.34%($P<0.01$); 血清中 T-SOD 活性升高 18.15%($P<0.01$)、MDA 水平显著降低 16.14%($P<0.01$)。小鼠肠道菌群属水平含量排在前的 20 的为 Ruminiclostridium($P=0.0017$)和 Lachnospirillum($P=0.0141$), 含量均增加。结论 黄芪超微粉具有明显的抗疲劳作用, 比其他 2 种给药方式好, 与增加能量供应、抗氧化、减少代谢物质蓄积直接相关。另外, 黄芪超微粉组的肠道菌群与空白组有明显差异, 肠道菌群变化或许与黄芪超微粉饮片抗疲劳间接相关。

关键词: 黄芪; 超微粉; 抗疲劳; 16S rDNA; 肠道菌群; 微生物多样性

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2022)20-2578-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.20.002

引用本文: 白雪松, 刘鹤, 宋岩, 等. 基于肠道微生态探讨黄芪超微粉饮片抗疲劳作用[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(20): 2578-2584.

Study on Anti-fatigue Effect of Superfine Powder of Astragali Radix Based on the Intestinal Microecology

BAI Xuesong^a, LIU He^a, SONG Yan^b, LYU Guangfu^c, LIN He^a, LIN Zhe^a, LI Yingqing^{a*} (Changchun University of Traditional Chinese Medicine, a.School of Pharmacy, b.School of Clinical Medicine, c.Ginseng Academy, Changchun 130117, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the anti-fatigue effect of Astragali Radix superfine powder on C57BL/6 mice and the changes of intestinal flora. **METHODS** The C57BL/6 mice were divided into Astragali Radix superfine powder high-dose group(2.50 g·kg⁻¹), medium-dose group(1.25 g·kg⁻¹), low-dose group(0.63 g·kg⁻¹), and traditional decoction group(2.5 g·kg⁻¹), traditional powder group(2.5 g·kg⁻¹) and blank group. Gavage was given for 30 consecutive days, during and after the administration, the body weight, behavioral indicators and biochemical indicators of the mice were measured. On the 30th day of perfusion, the contents of the colon were aseptically taken, DNA was extracted, the V3+V4 region of the 16S rDNA gene of the intestinal flora was amplified, and the β diversity and α diversity, the phylum and species of intestinal flora were analyzed by high-throughput sequencing. **RESULTS** Compared with the blank group, the rod climbing time, rotating rod distance and running distance of mice in the Astragali Radix superfine powder high-dose group were prolonged by 14.8%($P<0.05$), 26.8%($P<0.01$) and 16.2%($P<0.01$); mouse liver glycogen and skeletal muscle ATP increased, respectively 20.48% and 20.86%($P<0.01$) and the content of BUN and LA decreased by 5.87%($P<0.01$) and 12.34%($P<0.01$). The activity of T-SOD in serum increased by 18.15%($P<0.01$), and the level of MDA was significantly reduced by 16.14%($P<0.01$). The top 20 mouse gut microbiota levels were Ruminiclostridium($P=0.0017$) and Lachnospirillum($P=0.0141$), both increased. **CONCLUSION** Astragali Radix superfine powder has obvious anti-fatigue effect, which is better than the other two methods of administration, and is directly related to increasing energy supply, anti-oxidation, and reducing the accumulation of metabolites. In addition, the intestinal flora of the Astragali Radix superfine powder group is significantly different from that of the blank group. The change of the intestinal flora may be indirectly related to the anti-fatigue of Astragali Radix superfine powder decoction pieces.

KEYWORDS: Astragali Radix; superfine powder; anti-fatigue; 16S rDNA; intestinal flora; micro-biodiversity

基金项目: 吉林省科技发展项目(20190201153JC)

作者简介: 白雪松, 男, 硕士 E-mail: 7792521311@qq.com

*通信作者: 李银清, 女, 博士, 副研究员 E-mail: liag@foxmail.com

疲劳是机体复杂的生理生化过程,是机体的大脑或体力达到一定阶段时发生的生理现象。随着居民生活节奏的加快,疲劳变得极为普遍^[1]。在机体运动和生命活动中,能量代谢的过度积累、免疫系统功能障碍和氧化损伤等均会导致疲劳^[2]。而最近研究表明,患有慢性疲劳症的患者肠道微生物的水平出现异常。表明了慢性疲劳症并不仅仅是患者的大脑出现了问题^[3]。肠道菌群的正常组合遭到破坏,就会出现胃肠不适等病理表现,久之便会使消化、吸收功能降低,出现中医脾虚证的证候,进而导致慢性疲劳的发生;反之,由慢性疲劳造成的脾虚同样可能引起肠道菌群失调^[4]。故肠道菌群的变化与疲劳密切相关。

目前,消除疲劳的措施和药物还不尽如人意,一些药物可以提高运动能力,但含有类似兴奋剂的成分对身体具有一定伤害。许多草药植物能够减少或消除疲劳而不产生明显不良反应^[5]。黄芪是豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的干燥根,主要含有多糖类成分,在传统医学中黄芪被用于治疗全身虚弱、慢性疾病,并增加整个机体活力^[6]。将黄芪以先进的物理或化学手段制备成微粉及超微粉^[7],可以提高有效成分的溶出,增加生物利用率。

本研究基于黄芪的抗疲劳作用,以 C57BL/6 小鼠为模型,利用 16S rDNA 方法检测小鼠的肠道菌群变化,探讨黄芪超微粉对小鼠肠道菌群多样性以及疲劳的改善作用。

1 仪器、试剂与原料

500 型精密电子天平(美国双杰兄弟有限公司);小鼠跑步机、转棒仪、爬杆架(成都泰盟科技有限公司);ELx800 型全自动酶标仪(美国 BioTek 公司)。

肝原测定试剂盒、总超氧化物(total superoxide dismutase, T-SOD)歧化酶试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)试剂盒以及全血乳酸(lactic acid, LA)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,货号分别为 A043-1-1, A001-1-1, A003-1-2, CO14-2-1, A019-1-1;BCA 与 ATP 的检测盒(碧云天生物科技有限公司,货号分别为: S0026, P0010S)。

黄芪原药材超微粉饮片由东方红(通化)生物医药有限公司提供,由长春中医药大学药学院生药教研室翁丽丽副教授鉴定为豆科植物膜荚黄芪

Astragalus membranaceus (Fisch.) Bge.的干燥根。黄芪超微粉制备方法:选取上述药材,洗净,干燥灭菌,粉碎成细粉(即传统粉末);将细粉进行低温超微粉碎得破壁粉体,混匀,即得,经采用 BT-2001 型激光粒度分布仪(丹东百特仪器有限公司)测定本品的粒径为 37.61 μm 。粗粉为实验室打粉机制备。

健康 C57BL/6 小鼠 60 只,♂,8 周龄,体质量约 20 g,为长春亿斯实验动物有限公司提供,实验动物生产许可证号: SCXK(吉)2015-0005; IACUC: 20191135;饲养于长春中医药大学医学实验动物中心,每笼 5 只标记后饲养。

2 方法

2.1 分组与给药

小鼠随机分为黄芪超微粉饮片高、中、低剂量组,黄芪传统饮片组、黄芪传统粉末组、空白组。其中,黄芪超微粉饮片高剂量组为中国药典 2020 年版规定的临床常用剂量,中、低剂量组为该剂量逐级减半而来,黄芪的临床常用量为 2.5 g·kg⁻¹,空白组给予纯净水,按 20 mL·kg⁻¹ 剂量给药。传统饮片为以传统煎煮的方法制备。采用沸腾的纯净水冲泡粗粉组及超微粉饮片组,室温放置 30 min 后灌胃,不间断给药 30 d,小鼠在每天相同时间灌胃 1 次并测定体质量。

2.2 动物行为学试验

采用动物行为学考察口服黄芪超微粉对小鼠抗疲劳的作用。分为跑步、爬杆和转棒试验。跑步机训练为期 3 d:给药 21 d 的 C57BL/6 小鼠,在第 24 天早上灌胃后休息 30 min,设置跑步机转速为 20 m·min⁻¹,然后把小鼠放跑道中,设定时间为 1 h,记录跑步距离。转棒仪训练为期 2 d:在第 27 天早上灌胃后休息 30 min 后,设置转棒仪为 18 r·min⁻¹ 的速度,把小鼠放在指定位置,记录 180 s 内小鼠在设备上掉落的时间。如过程中未从设备掉下来,则记录 180 s。爬杆架训练为期 2 d:在第 30 天早上灌胃后休息 30 min,置小鼠在设备上,记录落水时间 3 次,计算总和。

2.3 生化指标与胃肠病理检查

在第 30 天给药后 30 min,使用乙醚麻醉小鼠,血清由经眼球取血而得,检查抗氧化(MDA、T-SOD)和代谢物质(LA、BUN)指标。取下动物股四头肌肉组织、肝组织以及肠道内容物,放入液氮速冻 30 min 后,保存在-80℃冰箱,测试其肝

糖原与肌肉 ATP。

2.4 粪便 DNA 提取及微生物多样性检测

液氮速冻实验小鼠肠道粪便 5 min, 冻存于 -80°C 冰箱。使用 Power Soil DNA 分离试剂盒从样品中提取总 DNA。分光光度计用 260 nm 的波长测定 DNA 的浓度和纯度。总体积为 20 μL 的 PCR 扩增, 使用 10 μL KOD FX Neo 缓冲液和 0.4 μL KOD FX Neo 以及 4 μL dNTP, 每种引物 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 50 ng DNA 为 1 μL 。使用 27 正向引物 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492 反向引物 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3', 通过 PCR 扩增 16S rDNA 基因的 V3~V4 区 (95 $^{\circ}\text{C}$ 持续 5 min, 然后进行 30 个循环, 然后分别是 95 $^{\circ}\text{C}$ 持续 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 持续 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 持续 1 min/1 kb, 并在 72 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 7 min), 纯化 PCR 产物。所有 PCR 产物均用 Quant-iTTM dsDNA HS 试剂进行定量。对细菌 16S rDNA V3+V4 区应用 Illumina Miseq 平台进行测序。测序结果进行 Alpha 和 Beta 多样性分析; 基于其注释结果, 可以得到各水平的物种组成信息。数据库的选择, 细菌使用 16S: Silva^[8] (Release132, <http://www.arb-silva.de>), 而真菌使用 ITS: Unite^[9] (Release 8.0, <https://unite.ut.ee/>)。

2.5 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 IBM SPSS Statistics 20 的软件分析数据, 单因素因素方差分析组间差异, β 多样性和 α 多样性的检验方法为 Bray-Curtis 算法, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

3 结果

3.1 黄芪超微粉饮片对小鼠跑步、转棒和爬杆的影响

在 C57BL/6 小鼠 30 d 给药期间, 和空白组比较, 黄芪超微粉饮片高剂量组小鼠的爬杆时间、转棒时间和跑步距离均增长, 分别为 14.8% ($P < 0.05$), 26.8% ($P < 0.01$) 和 16.2% ($P < 0.01$); 与传统饮片组相比, 黄芪超微粉饮片高剂量下小鼠的爬杆时间、跑步距离和转棒时间均增加, 分别是 3.3%, 15.6%, 5.3%, 无统计学意义, 结果见表 1。

3.2 黄芪超微粉饮片对小鼠体质量的影响

在 C57BL/6 小鼠 30 d 给药期间, 小鼠体质量变化见图 1。6 组小鼠的体质量处在稳定状态, 在 22 g 上下波动, 黄芪 3 个剂量组的超微粉饮片、黄芪传统饮片组、黄芪传统粗粉组, 与空白组比较, 对动物体质量没有显著影响。

表 1 黄芪超微粉饮片对小鼠跑步、转棒和爬杆的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab. 1 Effect of Astragali Radix superfine powder on running, turning rods and climbing rods of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	跑步距离/ m	转棒时间/ s	爬杆时间/ s
空白组	935 $\pm$ 97	123 $\pm$ 33	296 $\pm$ 28
传统饮片组	1 032 $\pm$ 126	135 $\pm$ 24	329 $\pm$ 44
传统粉末组	1 077 $\pm$ 120 ¹⁾	151 $\pm$ 20 ¹⁾	336 $\pm$ 55
黄芪超微粉饮片 高剂量组	1 087 $\pm$ 102 ¹⁾	156 $\pm$ 22 ²⁾	340 $\pm$ 57 ¹⁾
中剂量组	1 038 $\pm$ 106 ¹⁾	148 $\pm$ 25 ¹⁾	325 $\pm$ 49
低剂量组	944 $\pm$ 94	128 $\pm$ 26	312 $\pm$ 50

注: 与空白组相比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with blank group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$.

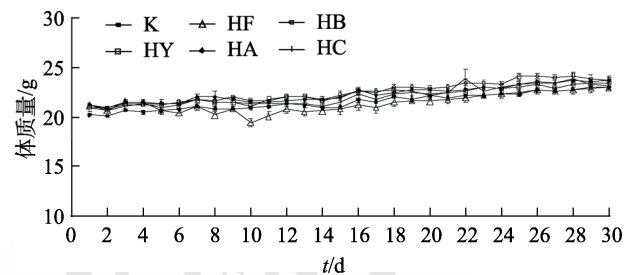


图 1 黄芪超微粉对小鼠体质量的影响

K-空白组; HY-传统饮片组; HF-传统粉末组; HA-黄芪超微粉高剂量组; HB-黄芪超微粉中剂量组; HC-黄芪超微粉低剂量组。

Fig. 1 Effects of Astragali Radix superfine powder on body weight of mice

K-blank group; HY-traditional herbal group; HF-traditional powder group; HA-Astragali Radix superfine powder high dose group; HB-Astragali Radix superfine powder middle dose group; HC-Astragali Radix superfine powder low dose group.

3.3 黄芪超微粉饮片对 C57BL/6 小鼠肝糖原、骨骼肌 ATP 水平的影响

糖原和 ATP 结果见表 2。与空白组相比, 黄芪超微粉饮片高剂量组小鼠的肝糖原和骨骼肌 ATP 均升高, 分别增加了 20.48% 和 20.86% ($P < 0.01$)。与传统饮片组相比, 黄芪超微粉饮片高剂量组小鼠的肝糖原和骨骼肌 ATP 均增加, 分别增加了 14.25% ($P < 0.01$) 和 5.38%。与传统粉末组相比, 黄芪超微粉饮片高剂量组小鼠的肝糖原和骨骼肌 ATP 升高 9.95%, 6.75%。

3.4 黄芪超微粉饮片对小鼠运动代谢物质 LA、BUN 的影响

代谢物质 LA、BUN 结果见表 3。与空白组比较, 黄芪超微粉饮片高剂量组小鼠血清中的 BUN 和 LA 的含量下降了 5.87% ($P < 0.01$) 和 12.34% ($P < 0.01$), 差异有统计学意义。与传统饮片组相比, 黄芪超微粉饮片高剂量组小鼠血清中的 BUN、LA 水平降低了 1.09%, 5.50%。

表 2 黄芪超微粉饮片对小鼠肝糖原和骨骼肌 ATP 水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab. 2 Effect of Astragali Radix superfine powder on the liver glycogen and ATP level of skeletal muscle in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	肝糖原/nmol·L ⁻¹	骨骼肌 ATP/nmol·mg ⁻¹
空白组	8.25±0.61	680.18±81.06
传统饮片组	8.70±0.88	780.11±72.59 ¹⁾
传统粉末组	9.04±0.81 ¹⁾	770.07±69.94 ¹⁾
黄芪超微 高剂量组	9.94±0.86 ^{2,3)}	822.07±92.58 ²⁾
粉饮片 中剂量组	8.45±0.37	757.02±116.92
低剂量组	8.32±0.82	746.86±81.86

注:与空白组相比较,¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与传统饮片组相比,³⁾ $P<0.05$ 。
Note: Compared with blank group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with traditional herbal group, ³⁾ $P<0.05$.

表 3 黄芪超微粉饮片对 C57BL/6 小鼠血清 LA、BUN 水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab. 3 Effect of Astragali Radix superfine powder on serum LA, BUN level of C57BL/6 mice($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	BUN/mmol·L ⁻¹	LA/mmol·L ⁻¹
空白组	18.22±0.86	2.35±0.20
传统饮片组	17.34±0.91 ¹⁾	2.18±0.20
传统粉末组	17.28±0.69 ¹⁾	2.10±0.26 ¹⁾
黄芪超微 高剂量组	17.15±0.46 ²⁾	2.06±0.20 ²⁾
粉饮片 中剂量组	17.33±0.72 ¹⁾	2.25±0.20
低剂量组	18.15±0.80	2.26±0.21

注:与空白组相比较,¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ 。
Note: Compared with blank group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

3.5 黄芪超微粉饮片对 C57BL/6 小鼠血清 T-SOD、MDA 水平的影响

小鼠 T-SOD、MDA 结果见表 4。和空白组相比,黄芪超微粉饮片高剂量组小鼠血清中的 T-SOD 活性升高 18.15%($P<0.01$)、MDA 水平显著降低了 16.14%($P<0.01$);与传统饮片组相比,黄芪超微粉饮片高剂量组小鼠血清中的 MDA 水平降低了 12.41% ($P<0.05$)、T-SOD 活性升高了 8.19%($P<0.05$)。与传统粉末组相比,黄芪超微粉饮片组小鼠血清中的 MDA 水平降低了 5.9%, T-SOD 活性升高了 5.45%,差异无统计学意义。

3.6 黄芪超微粉饮片对小鼠肠道微生物多样性作用

3.6.1 α 多样性 α 多样性反映的是单个样品物种丰度及物种多样性。稀释性曲线^[10]从样本中随机抽取一些序列,统计所抽取序列代表的物种数目,以序列数和物种数构建曲线,检验出测序数据量足够反映出样品中的物种多样性,反映样品中物种的丰富程度,见图 2。结果表明,随着抽取数量的加大,曲线趋于平缓,表示环境中的物种并不

表 4 黄芪超微粉饮片对 C57BL/6 小鼠血清 T-SOD、MDA 水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab. 4 Effect of Astragali Radix superfine powder on serum T-SOD, MDA Level of C57BL/6 mice($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	T-SOD/U·mL ⁻¹	MDA/nmol·mL ⁻¹
空白组	50.61±4.99	12.20±1.15
传统饮片组	55.27±4.61	11.68±0.97
传统粉末组	52.86±3.59 ¹⁾	10.82±1.14 ¹⁾
黄芪超微 高剂量组	59.80±4.79 ^{2,3)}	10.23±1.34 ^{2,3)}
粉饮片 中剂量组	54.68±4.51	12.31±1.29
低剂量组	50.63±5.91	11.68±1.62

注:与空白组相比较,¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与传统饮片组相比,³⁾ $P<0.05$ 。
Note: Compared with blank group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with traditional herbal group, ³⁾ $P<0.05$.

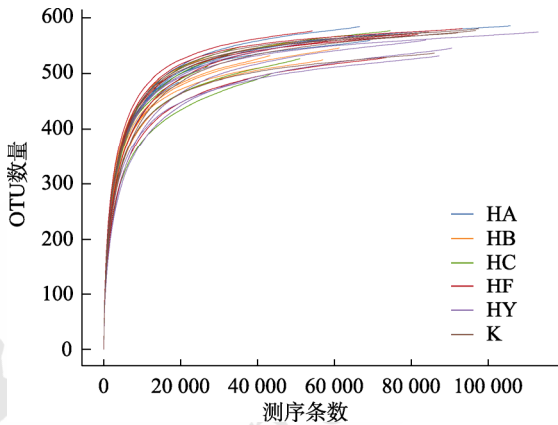


图 2 C57BL/6 小鼠肠道微生物样品稀释曲线($n=5$)

K-空白组; HY-传统饮片组; HF-传统粉末组; HA-黄芪超微粉高剂量组; HB-黄芪超微粉中剂量组; HC-黄芪超微粉低剂量组。

Fig. 2 Multy samples rarefaction curve of intestinal microflora in C57BL/6 mice($n=5$)

K-blank group; HY-traditional herbal group; HF-traditional powder group; HA-Astragali Radix superfine powder high dose group; HB-Astragali Radix superfine powder middle dose group; HC-Astragali Radix superfine powder low dose group.

会随测序数量的增加而明显增加,测序量足够反映样品物种多样性。

3.6.2 β 多样性 β 多样性主要分析了样本与样本间微生物群落组成的相似性。比较不同样品在物种多样性方面存在的相似程度。采用加权的方式,Bray-Curtis 算法计算样品间的距离从而获得样本间的 β 值,加权方法,需要同时考虑物种有无以及物种丰度两个问题。主坐标分析法^[11](principal coordinates analysis, PCoA),是一种与 PCA 类似的降维排序方法,通过 PCoA 可以实现多个样品的分类,进一步展示样品间物种多样性差异。在小鼠饲养第 30 天时,各给药组相聚较为紧密,组间差异较小。其中黄芪超微粉中剂量组和空白组完全分离,有明显的差异,见图 3。

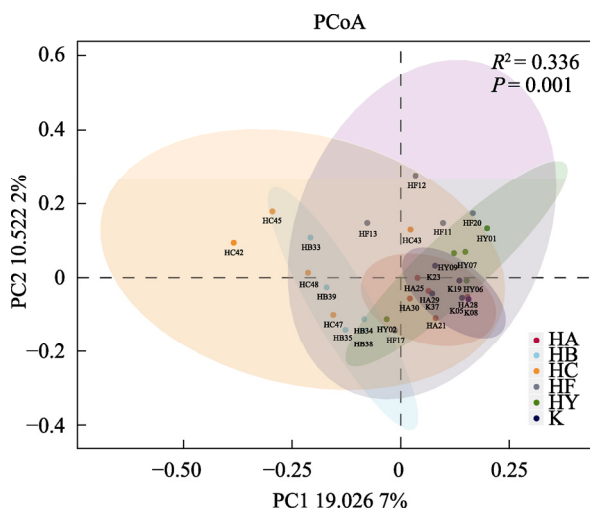


图3 C57BL/6小鼠肠道微生物主坐标分析

K-空白组; HY-传统饮片组; HF-传统粉末组; HA-黄芪超微粉高剂量组; HB-黄芪超微粉中剂量组; HC-黄芪超微粉低剂量组; 点分别表示各样品; 不同颜色代表不同分组; 横、纵坐标为导致样品间差异最大的2个特征值。

Fig. 3 Principal coordinates analysis of intestinal microflora in C57BL/6 mice

K-blank group; HY-traditional herbal group; HF-traditional powder group; HA-Astragali Radix superfine powder high dose group; HB-Astragali Radix superfine powder middle dose group; HC-Astragali Radix superfine powder low dose group. Plots represented the different samples. The different color district meant different groups. The horizontal and vertical coordinates represented the two characteristic values that caused the maximum difference between samples.

3.6.3 基于属水平差异性分析 黄芪超微粉高剂量组和空白组2组样品间微生物丰度的差异为

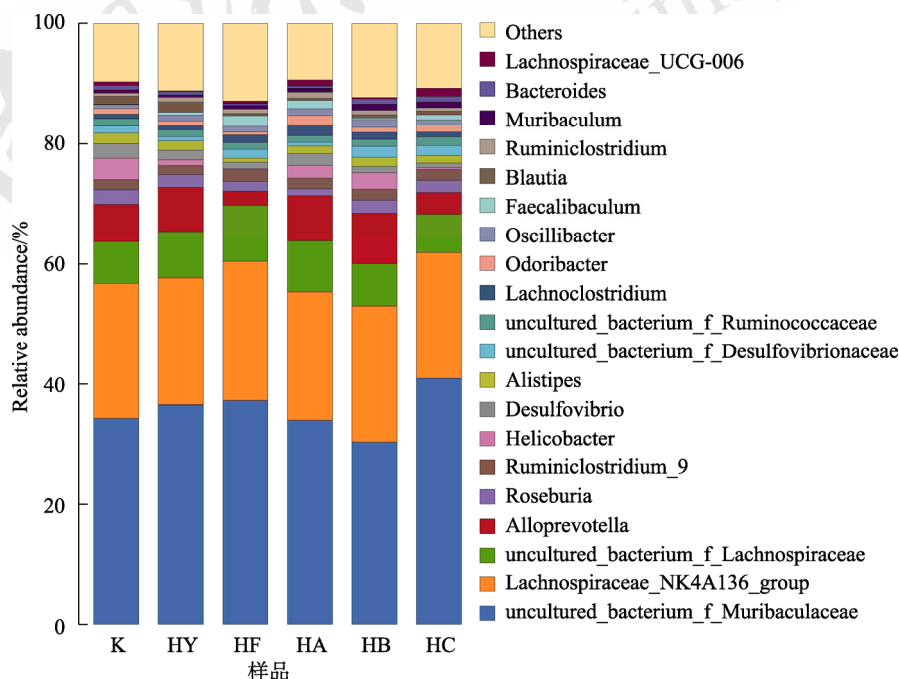


图4 C57BL/6小鼠肠道菌群属水平物种分布柱状图

K-空白组; HY-传统饮片组; HF-传统粉末组; HA-黄芪超微粉高剂量组; HB-黄芪超微粉中剂量组; HC-黄芪超微粉低剂量组。

Fig. 4 Distribution of intestinal flora in C57BL/6 mice

K-blank group; HY-traditional herbal group; HF-traditional powder group; HA-Astragali Radix superfine powder high dose group; HB-Astragali Radix superfine powder middle dose group; HC-Astragali Radix superfine powder low dose group.

Ruminococcaceae_UCG-003、Ruminiclostridium、Turicibacter、Bifidobacterium、Lachnoclostridium、Faecalibaculumha 含量增加; Parvibacter、Bilophila、Mucispirillum、Ruminococcaceae_UCG-013 含量减少。其中含量排在前20的为 Ruminiclostridium ($P=0.0017$) 和 Lachnoclostridium ($P=0.0141$), 含量均增加, 结果见图4。

3.7 小鼠肠道菌群功能基因预测

KEGG 代谢途径的差异分析揭示了样品组之间肠道微生物群落的代谢途径和功能基因方面的差异。KEGG 分析揭示了响应于环境变化, 肠道微生物群落代谢功能的调节和适应。遗憾的是通过筛选, 没有发现具有明显差异的基因。见图5。

4 讨论

跑步、转棒和爬杆3个方面可考察小鼠疲劳程度, 全面衡量黄芪超微粉饮片对C57BL/6小鼠的运动能力、肌肉力量以及协调能力的功效。结果表明, 与传统饮片组相比, 黄芪超微粉饮片组小鼠的爬杆时间、跑步距离和转棒时间虽然都有一定程度的增加, 但是并无显著的统计学差异。表明了黄芪药材经超微粉碎后具有原药材相应的有效属性, 超微粉碎没有改变其物质基础。黄芪

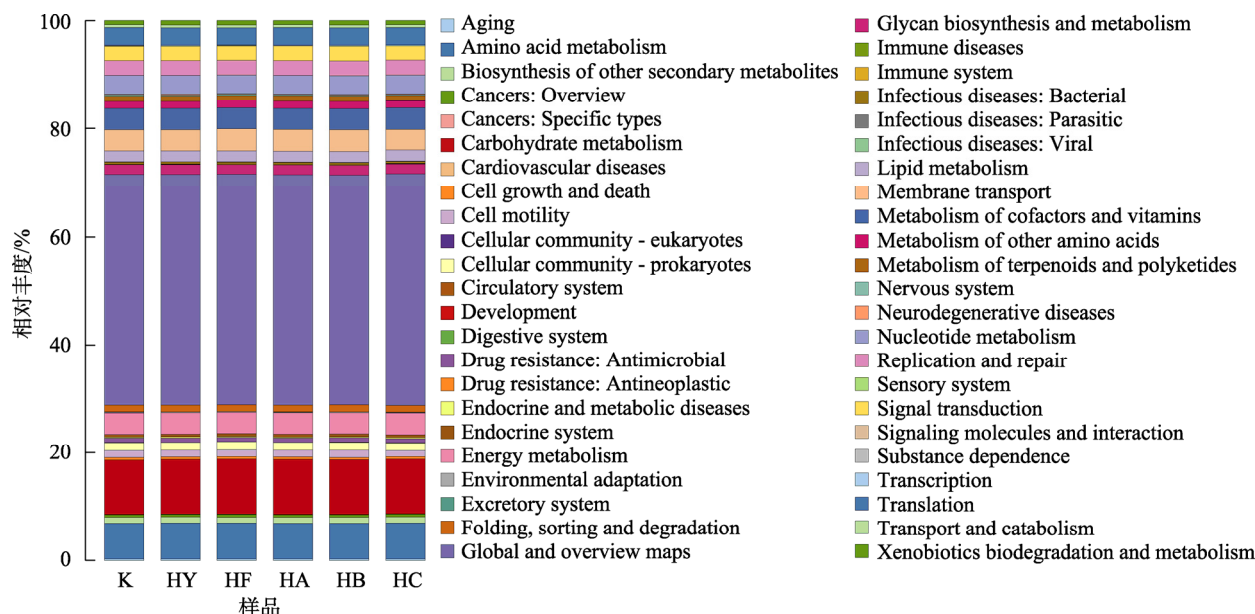


图5 各组功能基因预测的相对丰度

K-空白组; HY-传统饮片组; HF-传统粉末组; HA-黄芪超微粉高剂量组; HB-黄芪超微粉中剂量组; HC-黄芪超微粉低剂量组。

Fig. 5 Set of functional gene prediction of relative abundance

K-blank group; HY-traditional herbal group; HF-traditional powder group; HA-Astragali Radix superfine powder high dose group; HB-Astragali Radix superfine powder middle dose group; HC-Astragali Radix superfine powder low dose group.

超微粉饮片是应用超微粉碎技术将中药饮片粉碎后所得, 具有有利于保留生物活性成分, 可能减少因人体吸收差异而形成的药效差异的优点。

疲劳依据发生的相对部位, 可分为外周疲劳和中枢疲劳。多年来, 研究者先后提出多种疲劳的机制, 主要有能源耗竭学说、代谢产物堆积学说、自由基学说等。根据“能量消耗学说”, 运动引起的血糖和糖原含量的降低是疲劳的主要原因^[12]。运动开始时, 细胞内的 ATP 和葡萄糖被消耗, 血糖降低, 肝糖原分解为葡萄糖进入血液, 肌糖原分解, 进行有氧呼吸, 导致组织 ATP 和糖原含量下降^[13]。故糖原和 ATP 含量可以作为反映疲劳程度的重要指标。本实验结果发现黄芪超微粉饮片可以明显提高能量供应, 提高骨骼肌 ATP 与肝糖原的水平, 可能与黄芪超微粉碎后大量多糖物质释放有关。根据“氧自由基-脂质过氧化理论”, 运动和其他应激可导致体内氧自由基的产生, 引起细胞代谢紊乱, 工作效率下降和疲劳^[14]。黄芪超微粉饮片可显著升高 T-SOD 含量, 有效降低 MDA, 且优于黄芪传统饮片和黄芪传统粗粉的结果。MDA 是机体内氧自由基代谢产生的脂质过氧化物, SOD 可以清除自由基保护细胞受损。根据“代谢产物堆积学说”, LA 是无氧糖代谢的重要指标, 在高强度运动中作为糖酵解的最终产物形成。血

浆 LA 的高水平可以降低肌肉和血液的 pH, 损害某些器官, 产生疲劳^[15]。糖无氧酵解的产物是乳酸, 它主要在骨骼肌中产生。代谢物质积累是产生疲劳的因素, 黄芪超微粉饮片可提高代谢物质的清除。

不同的研究都只能解释疲劳症状的某一方面特征, 与肠道菌群的联系少之又少。了解肠道细菌与周围因素的关系对整个类健康的影响有重要作用。虽然胃肠道微生物区系的组成已被确认, 但对这些细菌的作用方式仍然知之甚少。肠道微生物群的建立已被证明是一个渐进的过程, 这种增加多样性的过程是适当发展所必需的^[16]。黄芪超微粉饮片在长期使用下对整肠道菌群属水平的 *Lachnoclostridium*^[17]、*Ruminiclostridium*^[18] 微生物有调节作用, 目前对二者研究的较少, 黄芪超微粉对二者有促进生长的作用。改变肠道微生物 *Lachnoclostridium*、*Ruminiclostridium* 的含量, 或许会与抗疲劳等传统功效相关, 需要通过粪移植的方式进一步研究进行验证。

黄芪超微粉饮片可作为缓解疲劳的快速冲泡的保健饮品, 也可将黄芪超微粉饮片按方制作成为供给临床调剂工作所使用的配方粉末, 既使中药具有现代应用的方便需求, 又可实现中医随证加减的临床应用要求。

REFERENCES

- [1] MA L, XUE P, SHEN J Y. Study effect of water extract of ant on anti-fatigue[J]. Chin J Appl Phys(中国应用生理学杂志), 2012, 28(5): 443-444, 453.
- [2] AZIZBEIGI K, STANNARD S R, ATASHAK S, et al. Antioxidant enzymes and oxidative stress adaptation to exercise training: Comparison of endurance, resistance, and concurrent training in untrained males[J]. J Exerc Sci Fit, 2014, 12(1): 1-6.
- [3] ROMAN P, CARRILLO-TRABALÓN F, SÁNCHEZ-LABRACA N, et al. Are probiotic treatments useful on fibromyalgia syndrome or chronic fatigue syndrome patients? A systematic review[J]. Benef Microbes, 2018, 9(4): 603-611.
- [4] CHENG Z D, CHEN Y G, ZHANG T. Influence of mild moxibustion on intestinal microflora of chronic fatigue rats[J]. Chin J Inf Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志), 2013, 20(1): 45-46, 63.
- [5] HU M, DU J, DU L D, et al. Anti-fatigue activity of purified anthocyanins prepared from purple passion fruit (*P. edulis* Sim) epicarp in mice[J]. J Funct Foods, 2020(65): 103725.
- [6] LIU P P, ZHANG F, SHI J. Determination of 8 glycosides and 4 aglycones in directionally processed *Astragalus membranaceus* under different temperatures by UPLC-MS/MS[J]. China Pharm(中国药房), 2020, 31(3): 287-293.
- [7] LI X L, LI W Y. Exploration on the effect of micro-powder technique on the application of traditional Chinese medicine[J]. China Pharm(中国药房), 2010, 21(11): 1053-1054.
- [8] QUAIST C, PRUESSE E, YILMAZ P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools[J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(Database Issue): D590-D596.
- [9] KÖLJALG U, NILSSON R H, ABARENKOV K, et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi[J]. Mol Ecol, 2013, 22(21): 5271-5277.
- [10] WANG Y, SHENG H F, HE Y, et al. Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of illumina tags[J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(23): 8264-8271.
- [11] SAKAKI T, TAKESHIMA T, TOMINAGA M, et al. Recurrence of ICA-PCoA aneurysms after neck clipping[J]. J Neurosurg, 1994, 80(1): 58-63.
- [12] QI L, YING L. The research on the impact of green beans sports drinks on relieving fatigue in sports training[J]. Open Biomed Eng J, 2015(9): 318-321.
- [13] YANG D, LIAN J, WANG L, et al. The anti-fatigue and anti-anoxia effects of Tremella extract[J]. Saudi J Biol Sci, 2019, 26(8): 2052-2056.
- [14] LI J H, HAO G M, CHENG H M, et al. Extraction and evaluation on anti-fatigue function of polysaccharide from auricularia auricula[C]. World Automation Congress. IEEE, 2012.
- [15] WESTERBLAD H, BRUTON J D, KATZ A. Skeletal muscle: Energy metabolism, fiber types, fatigue and adaptability[J]. Exp Cell Res, 2010, 316(18): 3093-3099.
- [16] PALMER C, BIK E M, DIGIULIO D B, et al. Development of the human infant intestinal microbiota[J]. PLoS Biol, 2007, 5(7): e177.
- [17] TIDJANI ALOU M, LAGIER J C, LA SCOLA B, et al. 'Lachnoclostridium massiliosenegalense', a new bacterial species isolated from the human gut microbiota[J]. New Microbes New Infect, 2016(14): 4-5.
- [18] MROUEH M, ARUANNO M, BORNE R, et al. The *xyl-doc* gene cluster of *Ruminiclostridium cellulolyticum* encodes GH43-and GH62- α -l-arabinofuranosidases with complementary modes of action[J]. Biotechnol Biofuels, 2019(12): 144.

收稿日期: 2021-11-20
(本文责编: 曹粤锋)