

莲房原花青素对 AGEs 诱导的小鼠肠道组织损伤 和微生物紊乱的改善作用

赵扩权¹, 张芬¹, 罗庆¹, 冯莹娜¹, 欧阳宇¹, 肖娟², 吴茜^{1*}

(¹湖北工业大学 发酵工程教育部重点实验室 湖北省工业微生物重点实验室

细胞调控与分子药物“111”引智基地 武汉 430068

²海南省食品营养与功能食品重点实验室 海口 570228)

摘要 研究莲房原花青素低聚体(LSOPC)对膳食晚期糖化终末产物(AGEs)诱导的小鼠肠道组织损伤和微生物紊乱的改善作用。选用健康的雄性小鼠为动物模型,分为4组,分别饲喂高AGEs AIN-93G饲料,高AGEs AIN-93G中分别添加质量分数为0.2%和0.5% LSOPC的饲料以及正常AIN-93G饲料(对照组),饲喂12周,分析AGEs对小鼠的体质量、进食及进水量、脏器指数、肠道组织损伤、结肠紧密连接蛋白和寡肽转运蛋白的表达、结肠内炎症因子及肠道菌群的影响以及LSOPC的改善作用。实验结果表明,0.2% LSOPC和0.5% LSOPC均对高AGEs诱导的小鼠组织损伤有明显的改善作用,同时也增加了结肠内紧密连接蛋白ZO-1、Occludin的表达量,减少寡肽转运蛋白Pept1的表达量,结肠内的炎症因子TNF- α 、IL-6及黏附因子VCAM-1、ICAM-1的表达量,小鼠肠道环境和肠道微生物紊乱也得到较为明显的改善,且与添加LSOPC呈剂量依赖关系。结论:LSOPC能够减轻膳食AGEs引起的小鼠肠道组织损伤和肠道微生物紊乱,具有发展为基础膳食营养补充剂的潜力。

关键词 莲房原花青素低聚体; 晚期糖化终末产物; 炎症因子; 肠道微生物

文章编号 1009-7848(2022)05-0070-14 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.05.009

美拉德反应主要发生在蛋白质的氨基和糖的羰基之间,是一种常见的非酶促褐变反应^[1],其产物复杂,包括类黑精、还原酮、含N和S的杂环化合物等,它们赋予食品棕色色泽,同时也赋予食品各种浓郁芳香的风味。近来研究发现,一些美拉德反应产物还可以清除自由基,具有抗氧化活性^[2]。其中,类黑精、还原酮等美拉德反应产物的抗氧化活性甚至与食品工业中常用的抗氧化剂不相上下。在关注美拉德反应及其产物的有利的一面时,也不应忽视美拉德反应对食品不利的一面,例如,影响食品的营养性,不利于必需氨基酸或矿物元素的吸收利用,以及伴生一些有害物质。晚期糖化终末产物(Advanced glycation end products, AGEs)作为美拉德反应的主要产物之一,是糖类和蛋白质、氨基酸在非酶促反应的情况下生成的

产物,在美拉德反应在终期阶段产生^[3]。而热加工方式、加工温度和加热时间对食物中AGEs的生成有极大的影响。例如,加热温度越高,加工时间越长,食物中AGEs的含量越高^[4]。人体内的AGEs主要来源于膳食AGEs的摄入,摄入量远远大于人体内自发形成^[5]。高AGEs食物摄入导致人体组织内AGEs含量增加,造成人体肾脏等器官的损伤^[6],升高人体氧化应激和炎症水平^[7]。大量研究表明,人体内过多积累的AGEs与一些人体慢性疾病的发病机理密切相关,如动脉粥样硬化、肾病、炎症反应等^[8]。

原花青素(Proanthocyanidins, PC)是一大类酚类聚合物的总称,在日常食物中广泛存在,尤其是植物性食品中含量丰富,具有抗氧化、抗炎等生物学效益。其中,原花青素低聚体以游离态的形式存在,凭借良好的水溶性,易被人体吸收等特点在国内外被广泛关注。目前,对原花青素的开发已扩展到多个植物品种,包括苹果、荔枝、葡萄等水果,茄子、紫薯、紫甘蓝等蔬菜,种子、果皮、坚果、茶叶、红酒等食品,PC在人类的膳食中占有重要地位^[9]。莲是一种天然植物资源,在我国分布非常广

收稿日期: 2021-05-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(32001705);海南省食品营养与功能食品重点实验室开放基金项目(KF202009)

作者简介: 赵扩权(1994—),男,硕士

通信作者: 吴茜 E-mail: wuqian@hbut.edu.cn

泛,在食用和药用方面具有很高的研究价值。莲的成熟花托(莲房)中含有丰富的莲房原花青素低聚体(Lotus seedpod oligomeric procyanidins, LSOPC),其具有抗氧化、免疫调节、降血脂、抗心肌缺血、抗肿瘤、抗辐射等多种生理功能^[10-14]。目前 LSOPC 的相关研究主要集中在食品加工过程中对 AGEs 的抑制^[15-17],而对机体内 AGEs 诱导的组织损伤及肠道菌群紊乱的调节作用鲜见报道。

本文选用健康的雄性小鼠作为动物模型,对小鼠体质量、进食及进水情况、脏器指数、肠道的 HE 病理染色情况、结肠紧密连接蛋白和寡肽转运蛋白的表达情况、结肠肠道内炎症因子及肠道菌群进行分析,探究 LSOPC 对 AGEs 诱导的小鼠组织损伤和肠道微生物紊乱的改善作用,为开发以 LSOPC 为功能因子添加剂的食品,降低 AGEs 引起慢性疾病的风险提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料试剂

采摘洪湖蓝田种植区“武植 2 号”莲房,去籽后按照本实验室前期已经确定的原花青素提取工艺(中华人民共和国专利 CN 1169804C)进行提取^[18],得到莲房原花青素粗提物粉末,再经乙酸乙酯 3 次萃取,冷冻干燥后得到莲房原花青素低聚体(LSOPC)。用盐酸正丁醇法检测,LSOPC 中的原花青素含量相当于葡萄籽原花青素含量的(106.22±0.46)%;用液相-质谱联用分析 LSOPC,发现聚合度为 3.2,在末端单元中有 74.2%的儿茶素和 25.8%的表儿茶素;而扩展单位的儿茶素、表儿茶素和表没食子儿茶素分别占 26.0%、43.1%和 30.9%。

吐温-20,国药集团化学试剂有限公司;甲醇,美国 Sigma 公司;DNA 试剂盒,赛默飞世尔科技有限公司;膜蛋白提取试剂盒,南京凯基生物技术有限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒,上海索宝技术有限公司。

1.2 仪器与设备

RE-3000 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器有限公司;高速冷冻离心机,德国 CHRIST 公司;KQ-50B 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;UV-1601 紫外-可见分光光度计,北京瑞丽

分析仪器有限公司;全自动酶标分析仪,Thermo Fisher Co;Alliance e2695 高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;Q-trap 液相质谱联用仪,美国 Agilent 公司。

1.3 方法

1.3.1 动物模型的建立 ICR 4 周龄雄性小鼠【SPF 级,从三峡大学实验动物中心获得,许可证号:SCXK(鄂)2017-0012】,共 36 只,体质量为 16~20 g,实验动物分笼喂养,每笼饲养 4~5 只。

控制的饲养环境条件为:温度为 21~23 ℃,湿度 55%~70%,12 h 白昼循环。

适应 2 周,分为 4 个实验组,每组随机选择 9 只。具体分组为:1)对照组(N):以标准的 AIN-93G 饲料喂食,该饲料由美国营养学会推荐,广泛应用于啮齿类实验动物;2)H-AGEs 组(H):将配制好的 AIN-93 饲料粉末,在 150 ℃高温条件下烘焙 2 h,压制成型,40 ℃烘干(维生素和矿物质在烘烤结束后,粉末降至室温再添加)制成高 AGEs AIN-93G 饲料喂养老鼠;3)H-AGEs+0.2% LSOPC 组(H2):向高 AGEs AIN-93G 饲料添加质量分数 0.2%的 LSOPC 制成饲料喂养老鼠;4)H-AGEs+0.5% LSOPC 组(H5):向高 AGEs AIN-93G 饲料添加质量分数 0.5%的 LSOPC 制成饲料喂养老鼠。

测定 4 组饲料中的碳水化合物、脂肪、蛋白质、能量及总 AGEs 的含量。4 组实验小鼠正常进食和进水,进食和进水量 2 d 测定 1 次,体质量 1 周测定 1 次,4 d 更换 1 次垫料,饲养 12 周。最后 1 周,将每只老鼠单独安置在代谢笼中,收集小鼠 24 h 粪便,便于后期肠道微生物试验和粪便组学分析。收集的粪便立即放入无菌冷冻管内,液氮骤冷,-80 ℃冰箱保存备用。给小鼠腹腔注射水合氯醛(10%,300 mg/kg)麻醉,腹主动脉取血(麻醉前空腹 12 h),摘除脾、肾脏、肝脏、肺、心、十二指肠、空肠、回肠、结肠,生理盐水清洗后,再用滤纸吸干,称重,用 4%的多聚甲醛溶液浸泡十二指肠、空肠、回肠、结肠等部分组织,用于组织病理分析,其余组织置于-80 ℃保存。根据湖北工业大学动物保护和和使用委员会的规定,所有的动物实验程序都遵循了实验室动物的护理和使用指南。

1.3.2 饲料 AGEs 含量测定 于 100 mL 离心管

中加入 1 g 粉末状饲料,再加入 1.2 mg/mL 的链霉蛋白酶 E(Pronase E)溶液 3 mL 溶于含 5 mg/mL SDS 和 1.47 mg/mL CaCl_2 的 Tris-HCl 中, pH 7.5)。漩涡振荡,置于摇床中 40 °C 振荡消化 36 h。消化后冷却,于 4 500×g, 4 °C 条件下离心 10 min。取上清, 0.45 μm 滤膜过滤,用 PBS 稀释到适当浓度后,再用荧光分光光度计测定荧光值,激发波长(λ_{ex})为 347 nm,发射波长(λ_{em})为 415 nm。荧光强度以 AU/g 表示。

1.3.3 脏器指数的测定 准确测定各组小鼠的脏器质量,小鼠的脏器指数计算公式如下:

$$\text{脏器指数 (g/kg)} = (\text{脏器质量/小鼠体质量}) \times 1000$$

式中,脏器中肾脏的质量为双肾的总质量。

1.3.4 肠道组织病理的观察 用 4% 的多聚甲醛溶液将小鼠的十二指肠、空肠、回肠、结肠等组织固定 24 h 以上,然后用梯度为 75%~95% 乙醇组织脱水,二甲苯清洗使组织透明。再进行石蜡包埋,切片和烤片,二甲苯脱蜡和 95%~70% 乙醇脱水。用苏木素对组织进行 5~7 min 染色,1% 盐酸酒精分化 2~5 s,自来水浸洗返蓝后,再用 1% 伊红对组织进行 2 min 染色,染色完成后用自来水浸洗、酒精脱水和二甲苯透明后进行镜检。

1.3.5 小鼠结肠组织免疫组化的测定 采用链霉菌抗生物素蛋白 2 过氧化氢酶(Strep tavidin peroxidase, SP)免疫组化技术,测定结肠中紧密连接蛋白(ZO-1、Occludin)和寡肽转运蛋白(Pept-1)在肠道黏膜上皮细胞的表达。

将结肠石蜡切片置于(65±3)°C 的烤箱烘烤 10 min,让组织与切片紧密黏附;石蜡切片二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱蜡,水化;去离子水清洗,中性 PBS 缓冲液平衡;切片倾泡在 pH=6,浓度为 0.01 mol/L 的枸橼酸盐缓冲液,加热使抗原修复,自然冷却,PBS 缓冲液清洗 3 次;3% 过氧化氢溶液孵育 15 min,以消除内源性过氧化物酶的活性,PBS 缓冲液清洗 3 次,每次 3 min;山羊血清工作液孵育 15 min,倾去,滴加 ZO-1 溶液(1:50,体积比)或者 Occludin 溶液(1:150,体积比),4 °C 条件下过夜;恢复至室温后 PBS 缓冲液清洗 3 次,每次 3 min;滴加生物素化二抗工作液(IgG),在 37 °C 条件下静置 15 min,用二胺基联苯胺(DAB)显色,显微镜

下控制显色反应程度,苏木精复染 40 s,再用水冲洗 5 min,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,封片,镜检拍照,阴性对照为以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗。ZO-1、Occludin、Pept-1 蛋白均为细胞质内表达,阳性细胞为细胞质内出现的棕黄色颗粒。

1.3.6 小鼠结肠组织内炎症因子和黏附分子表达的测定^[9] 采用 RT-PCR 分析小鼠结肠组织内炎症因子和黏附分子表达情况。

1.3.6.1 RNA 提取 向结肠组织中加入 1 mL Trizol,充分匀浆。再滴加 200 μL 氯仿,摇匀后室温静置 5 min。在 4 °C 条件下离心 15 min,转速为 12 000 r/min,转上层水相(约 400 μL)于新 1.5 mL EP 管中,再滴加 400 μL 异丙醇,摇匀后静置 10 min。再次离心后弃上清,沉淀用预冷的 70% 无水乙醇洗 3 次,空气干燥 5~10 min,复溶于 20 μL DEPC 水中。分光光度计测定 RNA 浓度。

1.3.6.2 逆转录生成 cDNA 反应体系包括 RNA 3.689 μg 、10 $\mu\text{mol/L}$ Oligo (dT) 2 μL 、2.5 mmol/L dNTP 2 μL 、Rnase free ddH₂O 约 14.5 μL 。反应条件:70 °C 5 min,短暂离心后置于冰上。再取上述反应液 14.5 μL 、5×RT 缓冲液 4 μL 、HRP(RRI)/RNase 抑制剂 0.5 μL 、M-MLV 1 μL 、Rnase free ddH₂O 20 μL 。反应条件:42 °C 60 min,95 °C 5 min。

1.3.6.3 RT-PCR 引物设计 RT-PCR 引物见表 1,反应体系包括 10 $\mu\text{mol/L}$ β -actin F 0.5 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ β -actin R 0.5 μL 、2.5 mmol/L dNTP 2 μL 、Ex Taq 0.25 μL 、10×Ex Taq E 缓冲液 2.5 μL 、cDNA 1 μL 、ddH₂O 约 25 μL 。反应条件:94 °C 4 min;94 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 25 s(30 个循环);72 °C 4 min;4 °C 4 min。

1.3.7 小鼠肠道菌群的分析

1.3.7.1 粪便菌群基因组总 DNA 的提取与检测 粪便样本需置于-80 °C 冰箱内保存,提取 DNA 前应避免反复冻融。总 DNA 采用试剂盒提取,用酶标仪测定其浓度及纯度,结果表明粪便样本 DNA 可用于后续试验。为了检测 DNA 完整性,在电压 150 V 的条件下用 1% 琼脂糖凝胶电泳 40 min。发现可见基因组 DNA 主条带,符合后续 PCR 试验要求。

1.3.7.2 16S rRNA V4 高变区 PCR 扩增及 Hiseq

表 1 实时定量 PCR 的引物设计

Table 1 Primer sequences design for real-time PCR

基因名称	序列	长度/bp
<i>β-actin</i>	F: 5'-CACGATGGAGGGGCCGACTCATC-3'	240
	R: 5'-TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3'	
<i>TNF-α</i>	F: 5'-TGCCTCAGCCTCTTCTCATT-3'	180
	R: 5'-GGGCTTGTCACTCGAGTTTT-3'	
	R: 5'-ACTGAAGCGAAAAGCCCTGTA-3'	
<i>IL-6</i>	F: 5'-AGTTGCCTTCTTGGGACTGA-3'	218
	R: 5'-ACAGTGCATCATCGCTGTTC-3'	
<i>ICAM-1</i>	F: 5'-TGTCAAACGGGAGATGAATGGT-3'	187
	R: 5'-CTGGCGGTAATAGGTGTAAATGG-3'	
<i>VCAM-1</i>	F: 5'-ACAAAACGCTCGCTCAGATT-3'	152
	R: 5'-GTCCATGGTCAGAACGGACT-3'	

测序 以样本提取的总 DNA 为模板, 采用细菌 16S rRNA V4 区通用引物 515F (GT-GCCAGCMGCCGCGGTAA) 和 806R (GGAC-TACHVGGGTWTCTAAT) 扩增其中的 16S rRNA V4 区基因。本试验 PCR 反应体系为 50 μL: 30 ng 模板 DNA, 4 μL 引物, 25 μL PCR 预混合溶液, 加 ddH₂O 至 50 μL。PCR 扩增条件: 98 °C 条件下预变性 3 min, 然后 98 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 30 个循环, 72 °C 最终延伸 7 min。所得 PCR 产物使用 Agencourt AMPure XP 磁珠进行纯化, 用 Agilent 2100 生物分析仪和实时定量 PCR 对纯化后的 PCR 产物进行定量和质量分析。用纯化后的 PCR 产物构建文库, 应用 Illumina HiSeq 2500 测序平台对扩增的 16S rRNA V4 高变区进行双末端 (Paired-end) 测序, 再进行生物信息学分析。

1.3.7.3 生物信息学分析 处理原始的下机数据时, 先进行数据过滤, 再利用每个样品引物的 barcode 序列识别各自的序列, 进行序列拆分。使用软件 FLASH (Fast length adjustment of shortreads, v1.2.11) 拼接经过处理和过滤的序列, 利用重叠关系将每个样品双末端测序得到的成对序列 (Pair end reads) 组装成一条序列, 得到最终的 16S rDNA V4 高变区序列。将处理拼接后的序列通过软件 USEARCH 聚类为分类操作单元 (Operational taxonomy units, OUT)。得到 OTU 代表序列后, 通过 RDP classifier (v2.2) 软件将 OTU 代表序列比对

Greengene 数据库进行物种注释, 将置信度阈值设置为 0.6。过滤注释结果, 确保后期分析用到的 OTU 都有注释结果, 再用选出的 OTU 进行操作单元聚类分析、菌群多样性分析、稀释性曲线分析和菌群分类学分析。

2 结果与分析

2.1 饲料成分分析

4 组实验组饲料的营养成分及总 AGEs 的含量如下表 2 所示。4 组饲料在碳水化合物含量、脂肪、蛋白质以及热量方面均没有显著差异, 排除因为饲料营养成分不同对实验结果造成的影响。AIN-93G 饲料经过高温加热以后, AGEs 的含量显著提高 ($P < 0.05$), H-AGEs 组中总 AGEs 的含量约为对照组的 3.7 倍。研究表明, 影响食物中 AGEs 增加的因素有很多, 如加热温度、加工时间、加工方式、pH 值及食物组成成分等。其中, 加热时间和加工方式尤为重要, 它能增加食物中 AGEs 的含量, 促进食物中的糖氧化和脂质氧化^[20]。

2.2 LSOPC 对不同组别小鼠进食、进水量和体质量的影响

小鼠实验周期中进食、进水量及体质量变化是反应生物学特征指标^[21]。健康小鼠分别喂食 4 组饲料 12 周后, 分析不同组别小鼠的进食、进水量及体质量变化。如表 3 所示, 喂食期间, 进食和进水量呈动态波动趋势。第 2 周到第 10 周, H-AGEs 实验组小鼠每日进食和进水量整体上低于

表2 饲料成分分析
Table 2 Feed composition analysis

成分	组别			
	对照组	H-AGEs	H-AGEs+0.2% LSOPC	H-AGEs+0.5% LSOPC
碳水化合物/g·(100 g) ⁻¹	56.39 ± 0.61	56.42 ± 0.26	57.91 ± 1.12	58.77 ± 0.51
脂肪/g·(100 g) ⁻¹	8.30 ± 0.71	8.25 ± 1.21	8.24 ± 0.56	8.27 ± 0.91
蛋白质/g·(100 g) ⁻¹	15.85 ± 0.71	15.90 ± 1.09	15.76 ± 1.73	15.81 ± 1.11
热量/kJ·(100 g) ⁻¹	1 535.78 ± 4.69	1 524.69 ± 9.79	1 522.93 ± 5.31	1 528.46 ± 2.13
总 AGEs/AU·g ⁻¹	1 403.08 ± 45.27	5 191.75 ± 248.24 ^a	4 996.55 ± 133.24 ^a	5 005.89 ± 74.56 ^a

注:^a表示对照组与另外3个实验组之间具有显著性差异($P<0.05$), $n=9$ 。



(a)对照组 (b)H-AGEs组 (c)H-AGEs+0.2% LSOPC组 (d)H-AGEs+0.5% LSOPC组
图1 4种饲料形态

Fig.1 The pictures of four feeds

其它组别,且差异显著($P<0.05$)。加入LSOPC后进食量有所改善,0.5% LSOPC添加量组的改善效果好于0.2% LSOPC添加量组,和正常组相当。高AGEs AIN-93G饲料的口感可能不如标准的AIN-93G饲料口感,进而影响了进食,其进食量低

于其它3组,而LSOPC的添加,改善了高AGEs AIN-93G饲料的风味,使得小鼠的进食量提高。然而,第10周到第12周,与对照组相比,另外3个实验组进食量并无显著性差异($P>0.05$)。

表3 进食量和进水量
Table 3 Food intake and water intake

饲喂 时间/ 周	对照组		H-AGEs组		H-AGEs+0.2% LSOPC组		H-AGEs+0.5% LSOPC组	
	进食量/ g·d ⁻¹	进水量/ mL·d ⁻¹	进食量/ g·d ⁻¹	进水量/ mL·d ⁻¹	进食量/ g·d ⁻¹	进水量/ mL·d ⁻¹	进食量/ g·d ⁻¹	进水量/ mL·d ⁻¹
2	8.54 ± 0.32 ^a	7.42 ± 0.74 ^A	6.75 ± 1.76 ^a	5.42 ± 1.41 ^A	7.23 ± 1.71 ^a	9.36 ± 1.41 ^A	7.28 ± 2.02 ^a	9.13 ± 0.92 ^A
4	7.02 ± 0.26 ^a	8.45 ± 1.01 ^A	6.48 ± 0.16 ^b	4.97 ± 0.46 ^B	6.95 ± 0.63 ^a	7.87 ± 0.31 ^A	7.79 ± 0.15 ^a	7.49 ± 0.51 ^A
6	6.95 ± 0.16 ^a	7.18 ± 0.34 ^A	6.19 ± 0.01 ^b	4.51 ± 0.02 ^B	6.65 ± 0.20 ^a	7.63 ± 0.00 ^A	7.96 ± 0.09 ^a	6.56 ± 0.81 ^A
8	7.31 ± 0.12 ^a	7.70 ± 0.67 ^A	6.65 ± 0.18 ^b	4.33 ± 0.56 ^B	6.80 ± 0.14 ^a	8.37 ± 1.18 ^A	7.67 ± 0.06 ^a	7.02 ± 0.56 ^A
10	6.67 ± 0.73 ^a	7.85 ± 0.39 ^A	6.81 ± 0.10 ^a	4.40 ± 0.08 ^B	6.94 ± 0.04 ^a	9.25 ± 1.96 ^A	7.47 ± 0.24 ^a	7.96 ± 0.11 ^A
12	5.59 ± 1.40 ^a	7.39 ± 0.77 ^A	5.16 ± 0.12 ^b	4.27 ± 0.08 ^B	5.33 ± 0.9 ^b	7.87 ± 0.08 ^A	6.66 ± 0.88 ^b	8.08 ± 0.52 ^A

注:不同大写字母表示H-AGEs组与另外3组实验组进食量之间具有显著性差异($P<0.05$),不同小写字母表示H-AGEs组与另外3组实验组进水量之间具有显著性差异($P<0.05$), $n=9$ 。

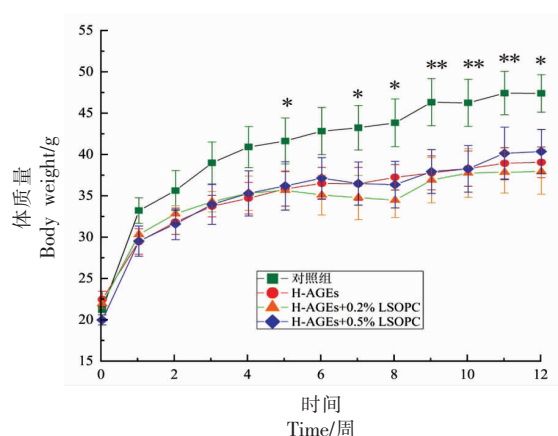
图2所示,小鼠的体质量随实验时间的增加而增加,对照组小鼠的体质量在实验过程中均大于其它组别。从第5周开始,组间差异显著($P<$

0.05),从第9周开始,与前8周相比,对照组小鼠的体质量增长极其明显($P<0.01$),远远大于同期其它实验组,与进食量和进水量呈正相关关

系。而 H-AGEs、H-AGEs+0.2% LSOPC、H-AGEs+0.5% LSOPC 3 个实验组小鼠的体质量差异不显著,由于 LSOPC 的添加使得小鼠的进食和进水量都高于 H-AGEs 组,然而体重并无显著差异,表明 LSOPC 对于小鼠体质量控制有一定程度的影响,这与王勇^[22]在原花青素对肥胖小鼠脂解作用和机制中的研究结果一致。

2.3 LSOPC 对不同组别小鼠脏器指数的影响

动物的脏器指数是评价其在实验阶段的生物学特征指标之一^[23]。正常小鼠体质量与脏器的比值,即脏器指数值较为恒定,而脏器指数的波动往往反应动物机体的变化。各实验组小鼠的脏器指数如表 4 所示:与对照组相比,除肺脏外,H-AGEs、H-AGEs+0.2% LSOPC、H-AGEs+0.5% LSOPC 3 个实验组小鼠的心脏、肝脏、脾脏和肾脏的脏器指数均大于正常组。H-AGEs 组小鼠各器官脏器指数最大,其中脾脏的脏器指数约为其它组别的 2 倍,且差异显著($P<0.05$)。随着 LSOPC 的添加,与 H-AGEs 组相比,H-AGEs+0.2% LSOPC 和 H-AGEs+0.5% LSOPC 实验组器官的脏器指数均降低,且脏器指数与 LSOPC 的添加量



注:* 和 ** 分别表示 $P<0.05$ 和 $P<0.01$, $n=9$ 。

图2 饲养过程中 4 组小鼠的体质量变化情况
Fig.2 Weight changes of mice in four groups during feeding

呈负相关($P<0.05$),表明 H-AGEs 饲料的摄入导致小鼠脏器指数增大,而脏器指数的增加也反映出小鼠在实验过程中可能出现脏器充血、水肿或者肥大增生等健康问题^[24]。实验结果提示 LSOPC 作为一种外源抗氧化剂的摄入能改善小鼠生长过程中器官的损伤。

表 4 小鼠脏器指数

Table 4 Organ indexes of mice

	脏器指数/ $g \cdot kg^{-1}$			
	对照组	H-AGEs 组	H-AGEs+0.2% LSOPC 组	H-AGEs+0.5% LSOPC 组
心脏	4.89 ± 0.43^b	6.09 ± 1.11^a	5.31 ± 0.54^a	4.98 ± 0.24^b
肝脏	34.46 ± 3.24^{ab}	40.79 ± 4.15^a	36.71 ± 3.40^a	35.68 ± 2.96^b
脾脏	1.65 ± 0.26^b	3.78 ± 0.57^a	1.70 ± 0.13^b	2.00 ± 0.73^b
肺脏	4.71 ± 0.70^b	5.16 ± 0.80^a	4.58 ± 0.42^{ab}	4.54 ± 0.38^a
肾脏	13.46 ± 1.08^{ab}	17.63 ± 0.63^a	15.15 ± 1.90^b	15.08 ± 1.56^b

注:不同小写字母表示 H-AGEs 组与其它 3 组在脏器指数间存在显著性差异($P<0.05$), $n=9$ 。

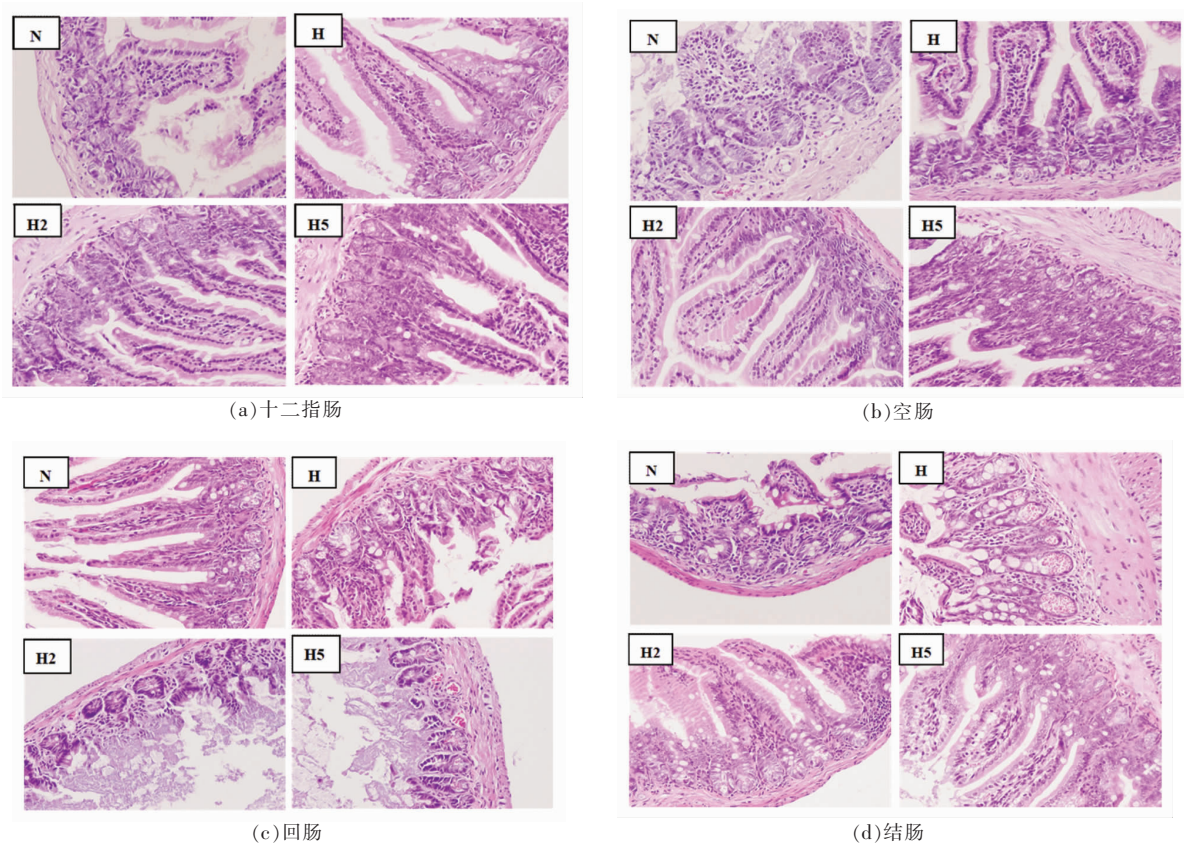
2.4 小鼠肠道组织切片 HE 染色分析

饲养 12 周,通过检测不同实验组小鼠肠道组织的病变情况,发现摄入 H-AGEs 饲料小鼠胃肠组织均出现不同程度的脂肪滴积累和病变,部分组织内部产生炎性细胞浸润。而在 H-AGEs 饲料中添加不同质量分数 LSOPC,能很大程度上降低小鼠的肠道组织表面的脂肪滴富集,减少炎性细胞浸润,对小鼠胃肠组织病变有很好的改善作用。

2.5 小鼠结肠内免疫组化分析

AGEs 分为游离态和结合态(肽结合态和蛋白

结合态)两种类型。其中,游离态 AGEs 的吸收与肠细胞紧密连接蛋白 ZO-1 和 Occludin 的表达密切相关,ZO-1 和 Occludin 的表达越高则游离态 AGEs 的吸收越低。寡肽转运蛋白 Pept-1 的表达量越高则结合态 AGEs 的吸收量越高^[25]。如图 4 所示,与对照组相比,H-AGEs 组 ZO-1 蛋白表达量显著降低($P<0.05$),向 H-AGEs 组中添加不同质量分数 LSOPC,H-AGEs+0.2% LSOPC 和 H-AGEs+0.5% LSOPC 组 ZO-1 的表达量均有提高,且表达量与添加 LSOPC 质量分数呈正相关;Oc-



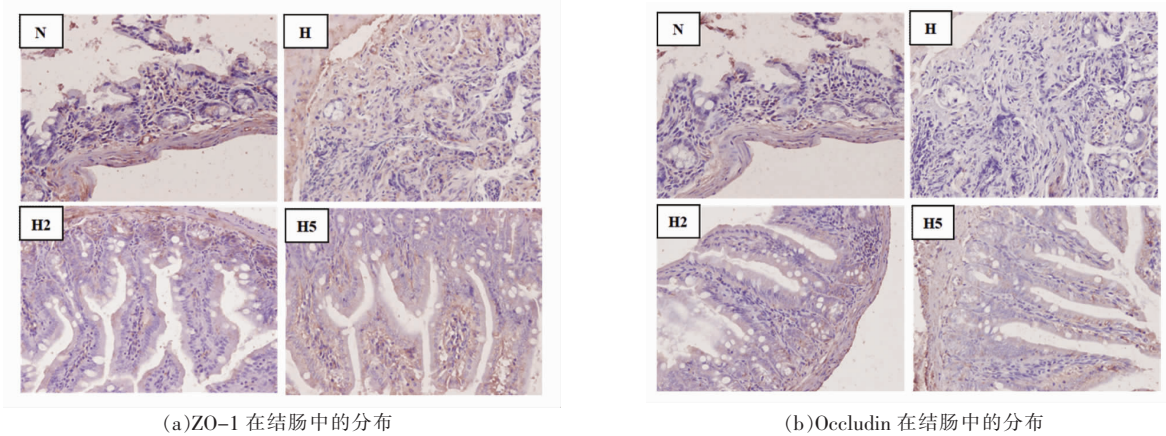
注:N表示对照组,H表示H-AGEs组,H2表示H-AGEs+0.2% LSOPC组,H5表示H-AGEs+0.5% LSOPC组,下同。

图3 小鼠肠道组织 HE 染色结果

Fig.3 HE staining results of mice gastrointestinal tissues

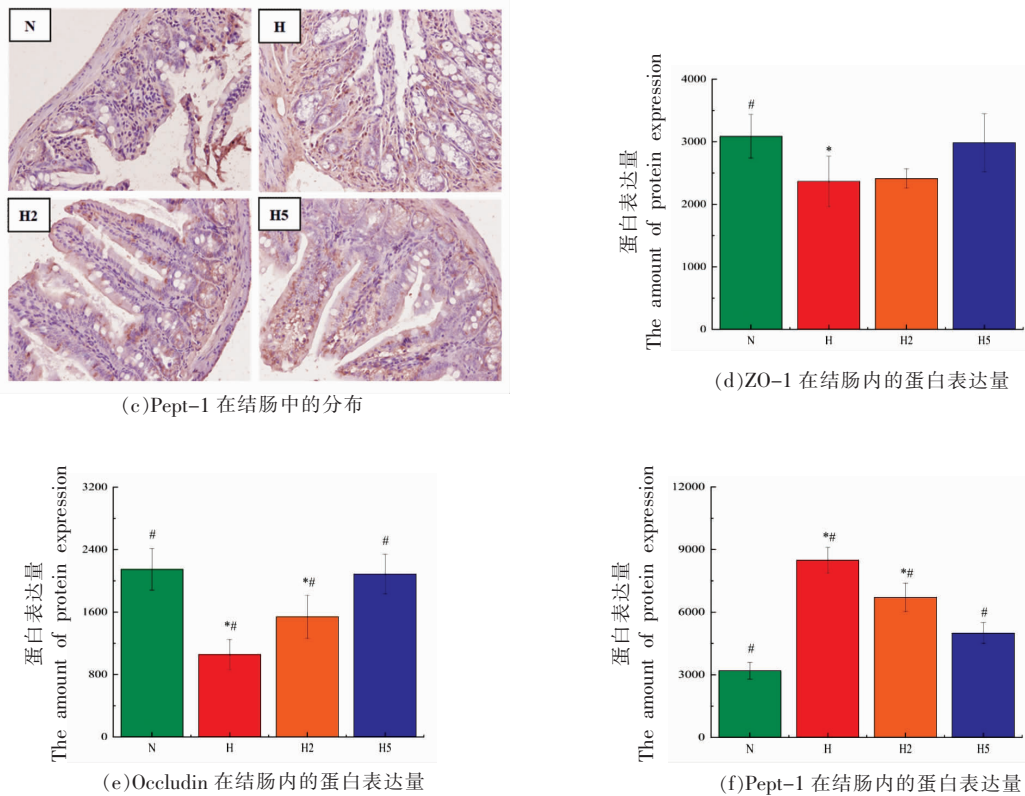
cludin 在对照组的表达量最大,与 H-AGEs 和 H-AGEs+0.2% LSOPC 组相比,差异显著 ($P<0.05$),而饲料中添加不同质量分数 LSOPC 喂养的小鼠,结肠组织内 Occludin 表达量均有显著增加 ($P<$

0.05);Pept1 蛋白表达量在 H-AGEs 组最大,在对照组小鼠结肠的表达量较少,LSOPC 的添加量与 Pept-1 的表达量呈负相关 ($P<0.05$)。



(a)ZO-1 在结肠中的分布

(b)Occludin 在结肠中的分布



注: * 和 # 分别表示 H-AGEs 与其它 3 组之间的显著性差异 ($P < 0.05$) 以及对照组与其它 3 组间的显著性差异 ($P < 0.05$)。

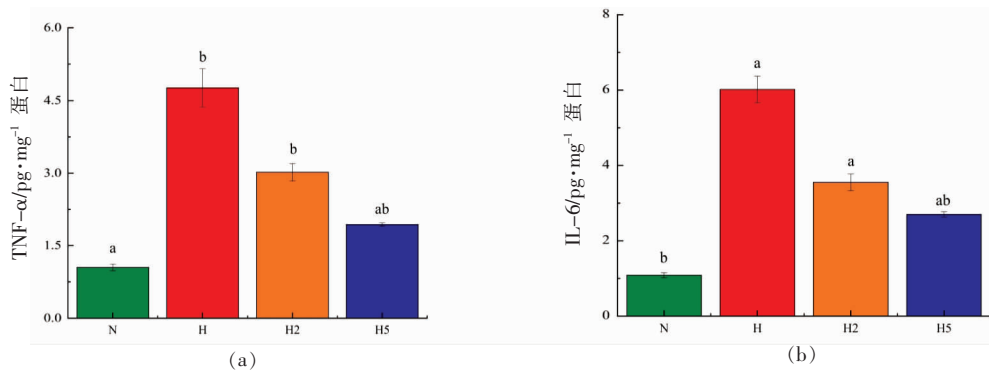
图 4 小鼠结肠组织免疫组化结果

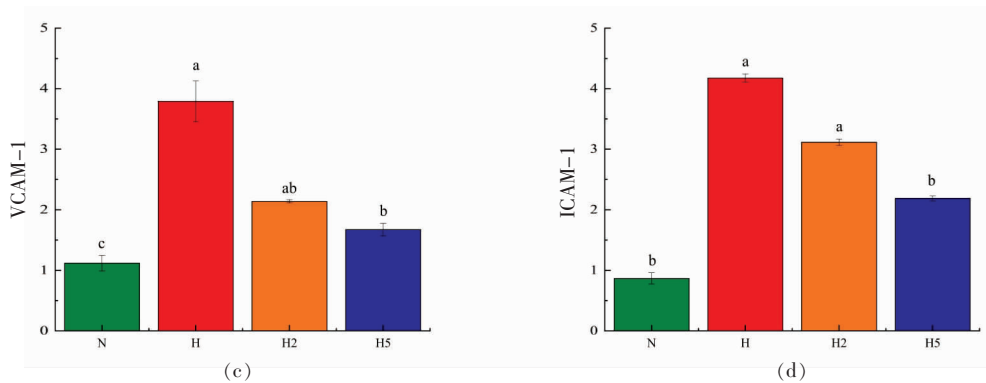
Fig.4 Immunohistochemical results of mice colon tissue

2.6 小鼠结肠组织内炎症反应分析

膳食 AGEs 的摄入, 使得机体内氧化应激和脂质过氧化水平增加, 加剧了自由基链反应, 导致体内促炎因子的释放^[26]。研究表明, 肠道内 AGEs 的累计会导致炎症性肠病患者的炎症反应^[27]。如图 5 所示, 与对照组相比, 3 组摄入 H-AGEs 的实验组小鼠结肠内炎症细胞因子表达量均显著增加 ($P < 0.05$), 其中 H-AGEs 组小鼠结肠内 TNF- α 表达量约为对照组的 4.5 倍, IL-6 的表达量约为对

照组的 5.5 倍。不同质量分数 LSOPC 的添加, 均能改善小鼠结肠内炎症水平, 且改善效果与 LSOPC 添加量呈正相关, 与 H-AGEs 组小鼠相比, 0.2% LSOPC 的添加使小鼠结肠内 TNF- α 和 IL-6 的表达量分别下降了 36.17% 和 40.86% ($P > 0.05$), 而 0.5% LSOPC 的添加使结肠内 TNF- α 和 IL-6 的表达量分别下降了 59.87% 和 54.86% ($P > 0.05$)。膳食中 AGEs 的摄入, 上调了结肠内炎症细胞因子水平, 减弱了肠道内抗氧化的防御, 刺激了小鼠结





注:不同小写字母表示不同组别之间的差异显著($P<0.05$)。

图5 小鼠结肠炎症因子表达情况

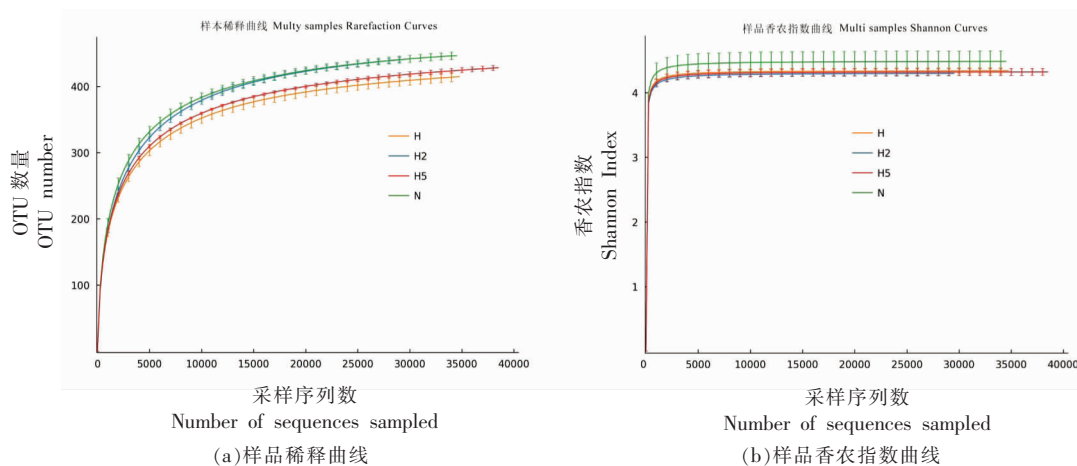
Fig.5 Expression of inflammatory factors in mice colon

肠内的炎症反应。血管细胞黏附因子(VCAM-1)和细胞间黏附因子(ICAM-1)在促进炎症部位的黏附性和调节机体免疫反应中起重要作用,影响小鼠结肠内炎症反应。H-AGEs组小鼠体内的VCAM-1和ICAM-1的表达量均大于对照组组($P<0.05$),而LSOPC的添加,能下调小鼠结肠内VCAM-1和ICAM-1的表达量,且与LSOPC的质量分数呈负相关($P<0.05$)。

2.7 小鼠肠道微生物的Alpha多样性分析

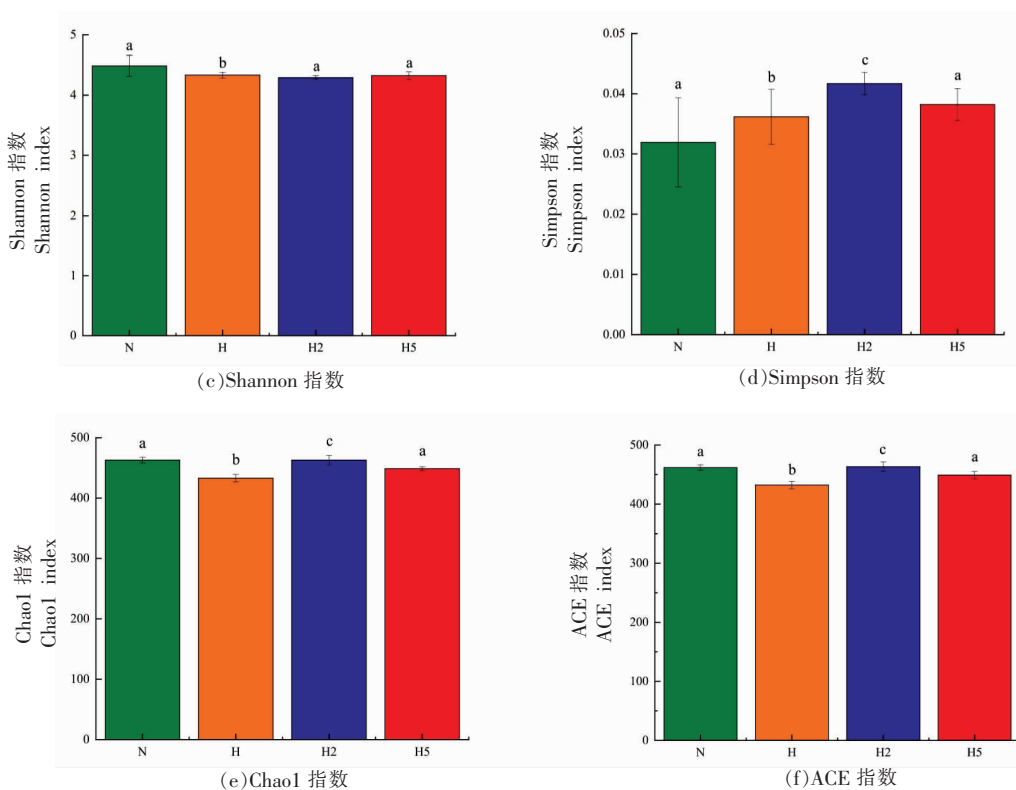
Alpha多样性采用稀释曲线(Rarefaction curve)和香农指数曲线(Shannon Index)来分析,Shannon和Simpson指数反映了物种的丰富度,Chao1和ACE指数反应了物种数量的多少^[28]。随着随机抽取的序列条数的增加,持续抽样下新物

种出现的速率急剧上升,表明群落中有大量的新物种被发现。如图6所示,4个实验组的稀释性曲线和香农指数曲线基本持平,说明4个分组的样品中大部分的肠道菌群微生物已被发现。对照组OTU数量明显大于其它3个组,说明当测定序列条数充分的情况下,随着测序数量的增加,对照组中样品物种的丰富和均匀度最大。两者结合得出,抽样条件充分,可用于数据分析。与H-AGEs组相比,对照组和添加LSOPC组Shannon指数、Simpson指数、Chao1指数和ACE指数都较高($P<0.05$),说明这3组小鼠肠道微生物的种类和数量都更多。这表明LSOPC的添加,能增加肠道微生物种类的均匀性和多样性。



(a)样品稀释曲线

(b)样品香农指数曲线



注:不同小写字母表示具有显著性差异($P < 0.05$)。

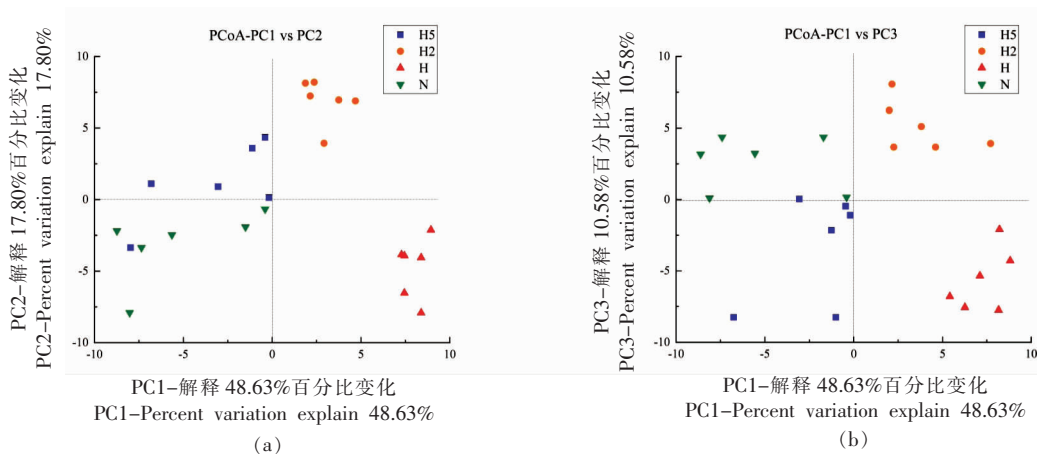
图 6 小鼠肠道微生物 Alpha 多样性分析

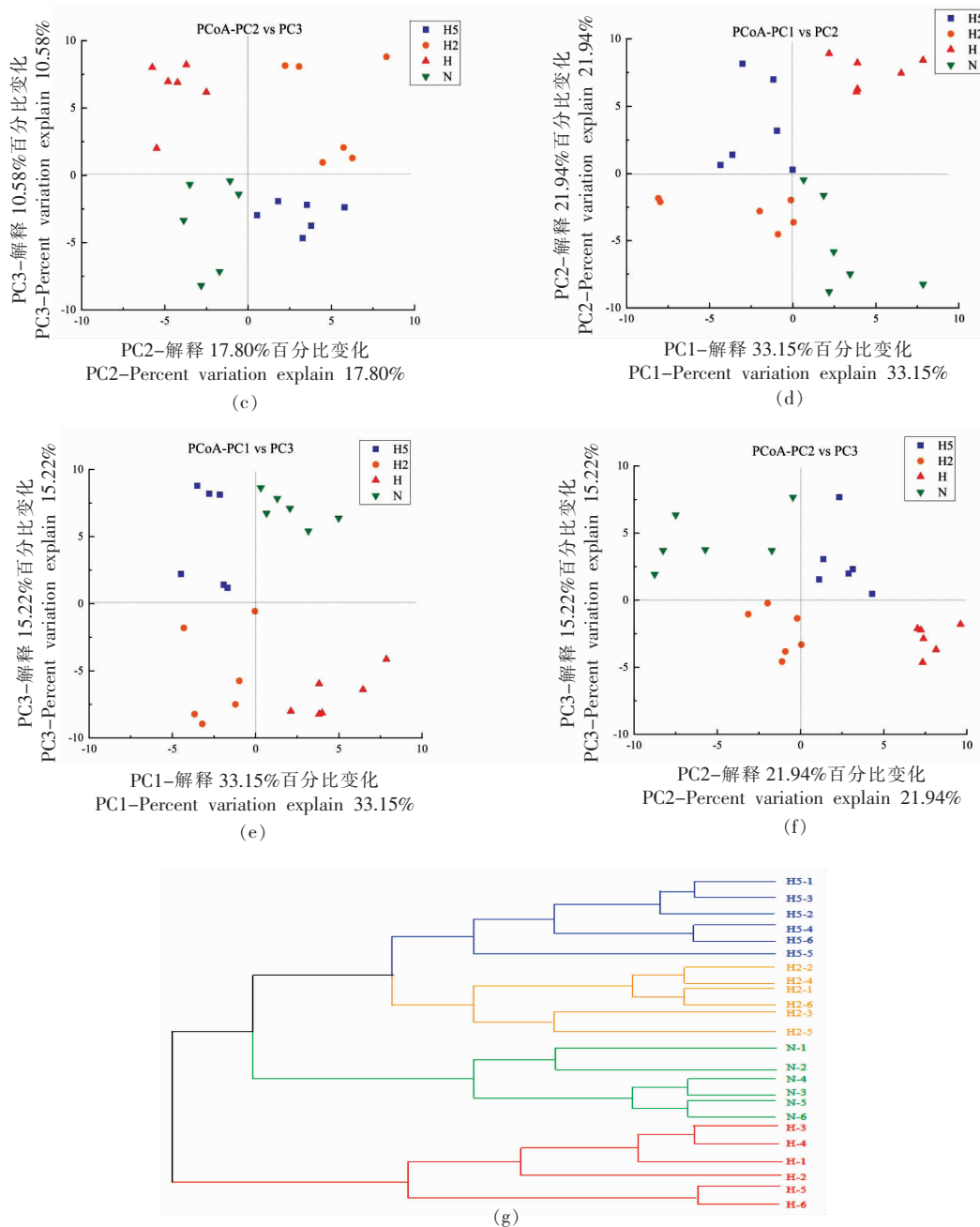
Fig.6 Analysis of Alpha diversity of intestinal microorganisms in mice

2.8 小鼠肠道微生物的 Beta 多样性分析

在 UniFrac 距离未加权与加权的基础上,图 7 中 PCoA 图(a~f)直观的显示了 4 个分组中的微生物群的结构差异^[29]。4 个组别中的差别明显分离,且 4 个实验组别中,33.15%和 48.63%的变化由 PC1 解释,17.80%和 21.94%的变化由 PC2 解释,10.58%和 15.22%的变化由 PC3 解释。基于 UPGMA 构建的聚类树(g)显示了 AGEs 依赖性的结

构重排,H-AGEs+0.5% LSOPC,H-AGEs+0.2% LSOPC,H-AGEs 和对照组 4 个分组中的小鼠完全聚集在各自的组中,相同分组内不同平行组间物种组成相似度较高。UPGMA 构建的聚类树显示,3 组小鼠粪便内的生物菌群明显区别于 H-AGEs。H-AGEs+0.5% LSOPC 组内物种相似匹配度与对照组较高,说明高质量分数 LSOPC 的添加,对小鼠粪便内生物菌群的物种改善效果明显。





注:(a)~(f)表示肠道菌群在不同小组上的主坐标分析(PCoA)图,其中(a)~(c)为加权算法图,(d)~(f)为非加权算法图;(g)为UPGMA 聚类树图。

图7 小鼠肠道微生物的Beta多样性分析

Fig.7 Analysis of Beta diversity of intestinal microorganisms in mice

2.9 小鼠肠道微生物物种注释及分类学分析

正常人群的肠道微生物主要有厚壁菌门,拟杆菌门,变形菌门,梭杆菌门和放线菌门。如图8所示,对照组的肠道微生物主要是拟杆菌门和厚壁菌门,且厚壁菌门与拟杆菌门的比值约为1.00,

其次为变形菌门,放线菌门及梭杆菌门所占比例较少。4个实验组中,H-AGEs组厚壁菌门所占比例最大,厚壁菌门与拟杆菌门的比值约为1.50。随着不同质量分数LSOPC的添加,厚壁菌门相对丰度下降,拟杆菌门相对丰度增加,H-AGEs+0.2%

LSOPC 组厚壁菌门与拟杆菌门的比值约为 1.41, H-AGEs+0.5% LSOPC 组厚壁菌门与拟杆菌门的比值则下降到 1.14。相关文献报道,厚壁菌门在肠道微生物中主要产丁酸^[30],LSOPC 可降低肠道微

生物产生的丁酸含量,这一结果可能与该组厚壁菌门占比减少有关。同时,这一结果也间接表明,肠道微生物可能是 LSOPC 的靶点之一。

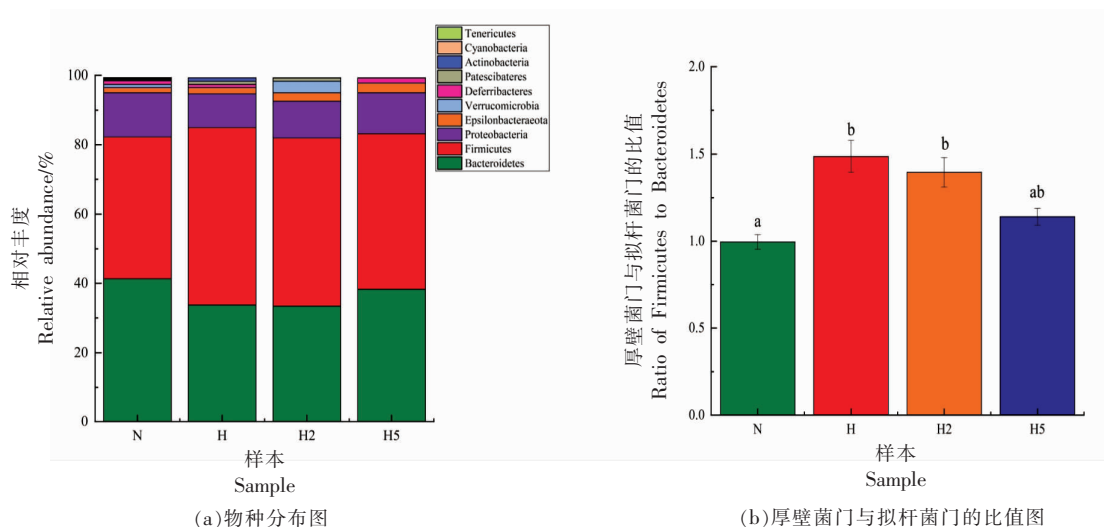


图 8 小鼠肠道微生物生物物种注释及分类学分析

Fig.8 Annotation and taxonomic analysis of intestinal microflora of mice

3 结论

本研究以健康小鼠为模型,比较不同质量分数 LSOPC 对摄入膳食 AGEs 后的小鼠体质量、肠道组织以及肠道菌群的影响。结果显示,H-AGEs 饲料的摄入导致小鼠脏器指数增大,LSOPC 作为一种外源抗氧化剂的摄入能改善小鼠生长过程中器官的损伤;摄入 H-AGEs 饲料小鼠肠道组织均出现不同程度的脂肪滴积累和病变,部分组织内部产生炎性细胞浸润。添加不同质量分数 LSOPC,能很大程度上降低小鼠的胃肠组织表面的脂肪滴富集,减少炎性细胞浸润,对小鼠肠道组织病变有很好的改善作用;膳食 AGEs 的摄入,增加了小鼠结肠内炎症细胞因子水平,减弱了肠道内抗氧化的防御,刺激了小鼠结肠内的炎症反应,LSOPC 的添加,能改善小鼠结肠炎症疾病,且与 LSOPC 的质量分数呈正相关($P<0.05$);膳食 AGEs 的摄入能够导致肠道菌群的紊乱,LSOPC 的添加,能提高小鼠肠道微生物多样性,厚壁菌门占比减少,改善小鼠肠道菌群的紊乱现象,且与 LSOPC 的质量分数呈正相关($P<0.05$)。研究结果为开发以 LSOPC 为基础的膳食营养补充剂改善 AGEs 引起的慢性疾

病提供支撑。

参 考 文 献

- [1] OH J G, CHUN S H, KIM D H, et al. Anti-inflammatory effect of sugar-amino acid Maillard reaction products on intestinal inflammation model *in vitro* and *in vivo*[J]. Carbohydrate Research, 2017, 449: 47-58.
- [2] LI K, YAO F, DU J, et al. Persimmon tannin decreased the glycemic response through decreasing the digestibility of starch and inhibiting α -amylase, α -glucosidase, and intestinal glucose uptake [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(7): 1629-1637.
- [3] WU Q, LUO Q, XIAO J S, et al. Catechin-iron as a new inhibitor to control advanced glycation end-products formation during vinegar storage [J]. LWT, 2019, 112: 108245.
- [4] URIBARRI J, WOODRUFF S, GOODMAN S, et al. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet [J]. Journal of the American Dietetic Association,

- 2010, 110(6): 911-916.
- [5] LUEVANO-CONTRERAS C, GARAY-SEVILLA M E, CHAPMAN-NOVAKOFSKI K. Role of dietary advanced glycation end products in diabetes mellitus [J]. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 2013, 18(1): 50-66.
- [6] URIBARRI J, CAI W, PEPPA M, et al. Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation end-products: Two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging[J]. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 2007, 62(4): 427-433.
- [7] HARCOURT B E, SOURRIS K C, COUGHLAN M T, et al. Targeted reduction of advanced glycation improves renal function in obesity[J]. *Kidney International*, 2011, 80(2): 190-198.
- [8] BUSCH M, FRANKE S, RÜSTER C, et al. Advanced glycation end - products and the kidney[J]. *European Journal of Clinical Investigation*, 2010, 40(8): 742-755.
- [9] OU K, GU L. Absorption and metabolism of proanthocyanidins[J]. *Journal of Functional Foods*, 2014, 7: 43-53.
- [10] XU J Q, RONG S, XIE B J, et al. Procyanidins extracted from the lotus seedpod ameliorate age-related antioxidant deficit in aged rats[J]. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 2010, 65(3): 236-241.
- [11] PEPPA M, URIBARRI J, VLASSARA H. The role of advanced glycation end products in the development of atherosclerosis[J]. *Curr Diab Rep*, 2004, 4: 31-36.
- [12] 郑智楷, 关瑞锦. 晚期糖基化终末产物致动脉硬化的研究及药物干预[J]. *中外医学研究*, 2011, 9(16): 163-164.
- ZHENG Z J, GUAN R J. Advanced glycosylation end products of research and drug intervention to hardening of the arteries [J]. *Chinese and Foreign Medical Research*, 2011, 9(16): 163-164.
- [13] 凌智群. 莲房原花青素及其生物、药理活性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2001.
- LING Z Q. Lotus seed pot procyanidins and biological and pharmacological activity research[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2001.
- [14] WU Q, LI S Y, YANG T, et al. Inhibitory effect of lotus seedpod oligomeric procyanidins on advanced glycation end product formation in a lactose-lysine model system[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2015, 18(2): 68-76.
- [15] WU Q, ZHAO K Q, CHEN Y Y, et al. Ethanol as an accelerator for the formation of advanced glycation end products in glucose-lysine solution [J]. *LWT*, 2020, 124: 109135.
- [16] WU Q, MIN Y Y, XIAO J S, et al. Liquid state fermentation vinegar enriched with catechin as an antiglycative food product [J]. *Food & Function*, 2019, 10(8): 4877-4887.
- [17] CHEN Y Y, TANG S M, CHEN Y S, et al. Structure-activity relationship of procyanidins on advanced glycation end products formation and corresponding mechanisms[J]. *Food Chemistry*, 2019, 272: 679-687.
- [18] 谢笔钧, 杨尔宁, 凌智群, 等. 一种用于从植物中提取原花青素的萃取剂及提取方法: CN 1169804C [P]. 2004-10-06[2021-01-10].
- XIE B J, YANG E N, LING Z Q, et al. Extractant and extraction method for extracting proanthocyanidins from plants: CN 1169804C[P]. 2004-10-06[2021-01-10].
- [19] WU Q, LI S Y, LI X P, et al. Inhibition of advanced glycation endproduct formation by lotus seedpod oligomeric procyanidins through RAGE - MAPK signaling and NF- κ B activation in high-fat-diet rats[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(31): 6989-6998.
- [20] DELGADO-ANDRADE C, SEIQUER I, HARO A, et al. Development of the Maillard reaction in foods cooked by different techniques. Intake of Maillard-derived compounds[J]. *Food Chemistry*, 2010, 122(1): 145-153.
- [21] QU W T, NIE C X, ZHAO J S, et al. Microbiome-metabolomics analysis of the impacts of long-term dietary advanced-glycation-end-product consumption on C57BL/6 mouse fecal microbiota and metabolites[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(33): 8864-8875.
- [22] 王勇. 原花青素对正常与肥胖小鼠的脂解作用及其机制研究[D]. 西安: 西北农林科技大学, 2011.
- WANG Y. Procyanidins lipolysis function of normal and obese mice and its mechanism[D]. Xi'an: Northwest A&F University, 2011.
- [23] 史先振. 木糖改善小鼠胃肠道功能的实验研究[D]. 苏

- 州: 苏州大学, 2005.
- SHI X Z. Xylose improve gastrointestinal function in mice experiment research[D]. Suzhou: Soochow University, 2005.
- [24] 何云山, 惠华英, 喻嵘, 等. 芦笋对高脂饮食小鼠脏器指数及血生化的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2018, 30(11): 1261-1265.
- HE Y S, HUI H Y, YU R, et al. Effects of *Asparagus* on organ index and blood biochemistry in mice on high-fat diet[J]. Chinese Journal of Microecology, 2018, 30(11): 1261-1265.
- [25] ZHAO D, SHENG B L, WU Y, et al. Comparison of free and bound advanced glycation end products in food: A review on the possible influence on human health [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(51): 14007-14018.
- [26] YUAN X J, ZHAO J S, QU W T, et al. Accumulation and effects of dietary advanced glycation end products on the gastrointestinal tract in rats[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2018, 53(10): 2273-2281.
- [27] 王韵阳, 张超英, 闫志勇. 茶叶水浸液对部分肠道致病菌的抑菌作用[J]. 青岛大学医学院学报, 2011, 47(6): 537-538.
- WANG Y Y, ZHANG C Y, YAN Z Y. Bacteriostatic effect of tea water immersion on some intestinal pathogenic bacteria[J]. Journal of Qingdao University School of Medicine, 2011, 47(6): 537-538.
- [28] QU W T, YUAN X J, ZHAO J S, et al. Dietary advanced glycation end products modify gut microbial composition and partially increase colon permeability in rats[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2017, 61(10): 1700118.
- [29] SCHUBERT A M, SINANI H, SCHLOSS P D. Antibiotic-induced alterations of the murine gut microbiota and subsequent effects on colonization resistance against *Clostridium difficile*[J]. MBio, 2015, 6(4): e00974.
- [30] LI X P, SUI Y, LI S Y, et al. A-type procyanidins from litchi pericarp ameliorate hyperglycaemia by regulating hepatic and muscle glucose metabolism in streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice fed with high fat diet[J]. Journal of Functional Foods, 2016, 27: 711-722.

Effect of Lotus Seedpod Oligomeric Procyanidins on Tissue Injury and Intestinal Microbial Disturbance of Mice Induced by AGEs

Zhao Kuoquan¹, Zhang Fen¹, Luo Qing¹, Feng Yingna¹, Ouyang Yu¹, Xiao Juan², Wu Qian^{1*}
(¹Key Laboratory of Fermentation Engineering, Ministry of Education, Hubei Key Laboratory of Industrial Microbiology, National "111" Center for Cellular Regulation and Molecular Pharmaceutics, Hubei University of Technology, Wuhan 430068
²Key Laboratory of Food Nutrition and Functional Food of Hainan Province, Haikou 570228)

Abstract To study the effects of lotus seedpod oligomeric procyanidins (LSOPC) on tissue damage and intestinal microflora disorder in mice induced by advanced glycation end products (AGEs), healthy male mice as animal model were divided into 4 groups and fed 12 weeks with high AGEs AIN-93G, high AGEs AIN-93G added 0.2% or 0.5% LSOPC (w/w), and normal AIN-93G as the control group. The effects of AGEs and LSOPC on mice weight, diet, water intake, organs indexes, intestinal tissue damage, colonic tight junction proteins and oligopeptide transporter expression, intestinal inflammatory factor and intestinal microflora disorder were analysis. Our results showed that both 0.2% LSOPC and 0.5% LSOPC had obvious ameliorative effects on tissue injury, increased the expression of ZO-1 and occludin, and decreased the expression of Pept1, TNF- α , IL-6, VCAM-1 and ICAM-1. Intestinal environment and intestinal microbial disorder were also significantly improved, which were dose-dependent on LSOPC. Conclusion: LSOPC could reduce mice tissue damage and intestinal microflora disorder caused by dietary AGEs, and has the potential to develop into a basic dietary supplement.

Keywords lotus seedpod oligomeric procyanidins; advanced glycation end products; inflammatory factor; intestinal microflora