

DOI: 10.12161/j.issn.1005-6521.2024.07.016

秀珍菇粉对小鼠肠道菌群、免疫功能及抗氧化活性的影响

吕建敏¹,袁海娜²,肖功年²,刘士旺²

(1. 浙江中医药大学 中医药科学院 动物实验研究中心, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江科技大学 生物与化学工程学院/轻工学院, 浙江 杭州 310023)

摘要: 为探讨秀珍菇粉营养功能, 将 40 只 C57BL/6 小鼠随机分为正常对照组(normal control, NC)、秀珍菇低(GPL)、中(GPM)、高(GPH)剂量组, 灌胃 40 d。结果表明: GPM、GPH 组血清谷氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)活性、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)和肌酐(creatinine, Crea)含量较 NC 组显著降低。与 NC 组相比, 各实验组血清和肾丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量明显降低; GPM、GPH 组血清超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性和肝过氧化氢酶(catalase, CAT)活性显著升高($P<0.05$)。各实验组血清和肾的谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性较正常对照组均明显上升。各实验组胸腺指数和 GPH 组 T 淋巴细胞刺激指数显著高于 NC 组。灌胃秀珍菇还可上调小鼠肠道厚壁菌门菌群丰度, 增加菌群物种数及 Alpha 和 Beta 多样性。综上所述, 秀珍菇粉可改善肠道微生态环境, 进而增强小鼠抗氧化和免疫功能。

关键词: 秀珍菇粉; 小鼠; 肠道微生物菌群; 免疫功能; 抗氧化

Effects of *Pleurotus geesteranus* Powder on Intestinal Flora, Immunity, and Antioxidant Functions in Mice

LÜ Jianmin¹, YUAN Haina², XIAO Gongnian², LIU Shiwang²

(1. Laboratory Animal Research Center, Academy of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China; 2. School of Biological & Chemical Engineering/School of Light Industry, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, Zhejiang, China)

Abstract: The nutritious function of *Pleurotus geesteranus* powder (GP) was studied. Forty C57BL/6 mice were randomized into four groups: normal control (NC) and low, medium-, and high-dose GP (GPL, GPM, and GPH, respectively). The mice in the GP groups were administrated with corresponding doses of GP by gavage for 40 d. The results showed that compared with the NC group, the GPM and GPH groups showed lowered serum levels of alanine aminotransferase (ALT), blood urea nitrogen (BUN), and serum creatinine (Crea). The three doses of GP lowered the levels of malondialdehyde (MDA) in the serum and kidney compared with the NC group. The GPM and GPH groups showed higher levels of serum superoxide dismutase (SOD) and live catalase (CAT) than NC group ($P<0.05$). Furthermore, compared with the normal control, the GP groups exhibited enhanced glutathione peroxidase (GSH-Px) activity in the serum and kidney and increased thymus index. The GPH group had higher T lymphocyte stimulation index than the NC group. In addition, GP increased the relative abundance of Firmicutes, the number of OTUs, and the Alpha and Beta diversity of intestinal flora. In conclusion, GP could improve the intestinal flora and enhance the antioxidant activity and immunity in mice.

Key words: *Pleurotus geesteranus* powder; mice; intestinal flora; immunity; antioxidant functions

引文格式:

吕建敏,袁海娜,肖功年,等. 秀珍菇粉对小鼠肠道菌群、免疫功能及抗氧化活性的影响[J]. 食品研究与开发, 2024, 45(7): 109-115.

LÜ Jianmin, YUAN Haina, XIAO Gongnian, et al. Effects of *Pleurotus geesteranus* Powder on Intestinal Flora, Immunity, and Antioxidant Functions in Mice[J]. Food Research and Development, 2024, 45(7): 109-115.

基金项目 浙江省重大科技专项重点农业项目(2015C02053)

作者简介: 吕建敏(1971—), 女(汉), 研究员, 博士, 研究方向: 实验动物营养与免疫、食品功能评价。

食用菌在我国历史悠久^[1]。随着人们对食用菌营养和生理功效研究的不断深入,食用菌的食用价值受到关注。食用菌中富含多糖、多酚、氨基酸、烟酸、钾、核黄素、硒、维生素和膳食纤维等重要营养成分,不仅具有多种生理作用,还具有益生元功效^[2-3]。研究发现,日粮中添加双孢菇粉可增加仔鸡粪便中双歧杆菌和乳杆菌的数量^[4];灌服富硒猴头菇冻干粉可使小鼠肠道中双歧杆菌和乳杆菌等益生菌数量显著增加,有害菌大肠埃希氏菌数量明显减少^[5];灌服香菇酶解物可明显增加小鼠肠道中细菌总数和乳酸菌数量,促进肠道中有益菌的生长,增强肠道免疫功能^[6]。因此,食用菌及其提取物可作为天然益生元,对维持肠道微生态平衡、保证机体健康起到关键作用。但食用菌种类繁多,不同食用菌对肠道菌群作用效果不同^[7],且目前有关此功效研究仅集中在少数品种上,大多数食用菌仍亟待开发。

秀珍菇(*Pleurotus geesteranus*)隶属担子菌亚门,层菌纲,伞菌目,侧耳科,侧耳属,最早发现于印度,现已在全国广为栽培^[8]。秀珍菇营养丰富,富含蛋白质和多糖,且氨基酸种类齐全^[9]。研究发现秀珍菇多糖具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎、抗衰老、降血糖、增强免疫、保护肝、肺组织等药理功效^[10-14],除多糖外,秀珍菇中还含有蛋白质、氨基酸、黄酮、多酚、维生素等营养物质^[8-9],能与多糖协同充分发挥其抗肿瘤、免疫调节、抗氧化等功效。本课题组前期利用H22荷瘤小鼠证实,秀珍菇粉具有较好的抑瘤作用^[15]。近年来,有关秀珍菇蛋白结构功能及其水解物的抗氧化功效研究备受关注^[16-17]。但目前秀珍菇在肠道菌群调控和免疫调节方面研究报道鲜见。因此,本研究以小鼠为研究对象,重点探讨秀珍菇粉对肠道菌群调节作用,并辅以生化、抗氧化和免疫功能指标的测定,旨在为秀珍菇功能食品的深层次研发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级C57BL/6小鼠40只:上海西普尔一必凯实验动物有限公司,雌性,年龄为6周龄,体质量为17~20 g,实验动物质量合格证号为20130016009288。

新鲜秀珍菇:缙云县珍稀食用菌专业合作社,经浙江科技大学刘士旺教授鉴定。

谷氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)检测试剂盒、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)检测试剂盒、肌酐(creatinine, Crea)检测试剂盒、总胆固醇(total cholesterol, CHOL)检测试剂盒、甘油三酯(triglyceride, TC)检测试剂盒、葡萄糖(glucose, GLU)检测试剂盒:德赛诊断系统(上海)有限公司;超氧化物歧

化酶(superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)测定试剂盒、过氧化氢酶(catalase, CAT)测定试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒:南京建成生物工程研究所。Hanks平衡盐溶液(Hank balanced salt solution, HBSS):美国Atlanta生物科技公司;刀豆素(canavalin, ConA)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、RPMI1640(Roswell Park Memorial Institute 1640 medium, RPMI1640)完全培养液、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO):美国Sigma公司。

16S rDNA测序试剂:热启动Flex DNA聚合酶预混液(Pusion Hot start flex 2X Master Mix):上海仪涛生物仪器有限公司;2 000 bp范围的双链线状DNA分子量大小参照(DL2000 DNA Maker):日本Takara公司;核酸染料(Gene colour):北京金博益生物技术有限公司;双链DNA荧光定量检测试剂盒(Qubit dsDNA HS Assay Kit),500次:美国Thermo Fisher公司;G-10琼脂糖(Agarose G-10):西班牙Biowest公司;50×TAE缓冲液[由三羟甲基氨基甲烷(tris(hydroxymethyl)amino-methane, tris base)、乙酸(acetic acid)和乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)组成]:生工生物工程(上海)股份有限公司;聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)片段纯化试剂盒(PCR Cleanup Kit):美国Axygen公司。

1.2 仪器与设备

RHP-600型高速多功能粉碎机:浙江荣浩工贸有限公司;GM-SY-B型纳米冲击磨:秦皇岛市太极环纳米制品有限公司;DK-450B型电热恒温水槽:上海森信实验仪器有限公司;X-15R离心机:美国Beckman Coulter公司;7020型全自动生化分析仪:日本日立公司;iMark酶标仪:美国伯乐公司;Forma3111型CO₂培养箱:美国Thermo公司;Centrifuge 5424常温离心机:德国Eppendorf公司;Microfuge R 22R Centrifuge冷冻离心机:美国Beckman Coulter公司;WH-861 Vortex Shaker旋涡振荡仪:太仓市华利达实验设备有限公司;DK-8D三温三控恒温水浴锅:上海博迅实业有限公司;A200型聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪:杭州朗基科学仪器有限公司;R EPS300电泳仪、2500型凝胶成像仪:上海天能公司;miseq高通量测序仪:美国illumina公司;DW-HL388超低温冷冻储存箱:中科美菱低温科技股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 秀珍菇粉(*Pleurotus geesteranus* powder, GP)制备

将新鲜秀珍菇于50~70℃下烘干8 h,使用高速多功能粉碎机粉碎成粉末,过40目筛。为增加秀珍菇粉与溶剂接触表面积,提高生物利用率^[18],将上述粉末用

纳米冲击磨研磨,研磨时冷凝温度为 25 ℃,连续运行 3 h 后,将所得粉末过 6 000 目筛,即得实验用秀珍菇粉。

1.3.2 小鼠分组及处理

将 40 只 6 周龄雌性 C57BL/6 小鼠适应饲养 1 周后,随机分为 4 组,每组 10 只,分别为正常对照(normal control, NC)组,秀珍菇粉低(GPL)、中(GPM)、高(GPH)剂量组。正常对照组小鼠灌服 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液(carboxymethylcellulose sodium solution, CMCNa),秀珍菇粉低、中、高剂量组小鼠分别灌服剂量为 500、1 000、2 000 mg/kg BW 的秀珍菇粉 CMCNa 混悬液,各组小鼠灌胃容量均为 0.2 mL/10 g BW。动物实验周期为 40 d。动物实验在浙江中医药大学动物实验研究中心进行,实验动物使用许可证号为 SYXK(浙)2018-0012。动物实验方案获得实验动物饲养管理使用委员会审查批准(审批号:1ACUC 2018091705)。

1.3.3 平均日增重和脏器指数测定

分别在实验开始(m_1, g)和实验结束(m_2, g)称量小鼠空腹体质量,小鼠平均日增重($A, g/d$)的计算公式如下。

$$A=(m_2-m_1)/D$$

式中: D 为实验时间,40 d。

实验结束取小鼠脾脏、胸腺、肝脏和肾脏并称量,脏器指数($X, %$)的计算公式如下。

$$X=M/m_2 \times 100$$

式中: M 为脏器质量, g ; m_2 为实验结束时小鼠空腹体质量, g 。

1.3.4 小鼠血清生化指标和抗氧化指标测定

实验结束,取血,分离血清,参照试剂盒说明书,利用全自动生化分析仪测定小鼠血清中 ALT 活性、GLU、BUN、Crea、CHOL、TC 含量;利用酶标仪测定小鼠血清中 SOD 和 GSH-Px 的活性及 MDA 含量。

1.3.5 小鼠肝、肾抗氧化指标测定

实验结束取小鼠肝、肾,分别制备肝、肾组织匀浆,参照试剂盒说明书,利用酶标仪测定小鼠肝、肾组织匀浆中 SOD、GSH-Px 和 CAT 活性及 MDA 含量。

1.3.6 小鼠脾淋巴细胞增殖实验

参照文献[19]方法进行,无菌取脾,置无菌培养皿中将其磨碎,利用尼龙绸布过滤至 10 mL 离心管中,用 Hanks 平衡盐溶液洗涤,合并洗涤液,4 ℃、1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,加 Hanks 平衡盐溶液至 7 mL,将细胞混匀,再 4 ℃、1 500 r/min 离心 5 min,重复 2 次。所获每个脾脏的淋巴细胞用 2 mL RPMI 1640 完全培养液混悬。取上述脾淋巴细胞混悬液 0.1 mL 加 3.9 mL 台盼蓝溶液,混匀,于显微镜下计数,再用 RPMI 1640 完全培养液将原液稀释至 1×10^7 个细胞/mL。取 96 孔板,每个样品分别设 4 孔重复和 4 个阴性对照孔。先

在每孔中加入 1×10^7 个细胞/mL 脾淋巴细胞混悬液 100 μ L,随后在各样品孔中加入 100 μ L 2.5 μ g/mL 的 ConA(或 5.0 μ g/mL 的 LPS),在各阴性对照孔中加入 RPMI1640 完全培养液 100 μ L。将加样后 96 孔板置于 37 ℃的 5% CO₂ 培养箱中培养 72 h,每孔加入 MTT 10 μ L,继续培养 4 h,4 ℃、1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 DMSO 150 μ L,充分振荡,用酶标仪于 570 nm 处分别测样品孔(B_1)、阴性对照孔(B_2)的吸光度。T 淋巴细胞或 B 淋巴细胞刺激指数(R)的计算公式如下。

$$R=B_1/B_2$$

1.3.7 小鼠肠道微生物 16S rDNA 测序

实验结束,用 CO₂ 吸入法处死小鼠,取小鼠结肠内容物,经 DNA 提取及检测、PCR 扩增、产物纯化、文库制备与库检、miseq 高通量测序仪上机测序等步骤,进行小鼠肠道微生物 16S rDNA 测序。

1.4 数据处理

采用 SAS 8.1 统计软件的 ANOVA 分析进行单因素方差分析,并进行 Duncan 多重比较,结果以平均值 \pm 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 秀珍菇粉对小鼠生长性能的影响

一般状态观察显示,实验组和正常对照组小鼠状况良好,被毛光滑,采食、饮水正常,无死亡情况发生。体质量、脏器指数是评估药物和食品毒副作用的重要指标,体质量和脏器指数异常变化一般先于器官组织的病理改变^[20]。秀珍菇粉对小鼠平均日增重和肝、肾指数的影响见表 1。

表 1 秀珍菇粉对小鼠平均日增重和肝、肾指数的影响

Table 1 Effects of *Pleurotus geesteranus* powder on average daily weight gain and liver and kidney indices in mice

组别	平均日增重/g	肝指数/(g/100 g)	肾指数/(g/100 g)
NC 组	0.046 \pm 0.028	3.72 \pm 0.17	1.11 \pm 0.06
GPL 组	0.039 \pm 0.022	3.82 \pm 0.25	1.11 \pm 0.05
GPM 组	0.037 \pm 0.028	3.89 \pm 0.22	1.12 \pm 0.11
GPH 组	0.041 \pm 0.034	3.43 \pm 0.19	1.11 \pm 0.03

注:无标注表示差异不显著, $P>0.05$ 。

由表 1 可知,灌服秀珍菇粉 CMCNa 混悬液 40 d 后,各实验组小鼠均存活,实验结束各组小鼠体质量均有增加,各实验组小鼠平均日增重和肝、肾指数与正常对照组相比均无显著差异($P>0.05$),结果表明秀珍菇粉对小鼠无毒副作用,具有食用安全性。

2.2 秀珍菇粉对小鼠血清生化指标的影响

血清 ALT、BUN、Crea、CHOL、TC、GLU 是进一步评估动物健康状况的重要生化指标,指标异常升高可预示机体某些器官和功能的病变。如血清 ALT 活性、

BUN、Crea 含量异常升高是肝、肾功能受损的重要标志。秀珍菇粉对小鼠血清生化指标的影响见表 2。

由表 2 可知,各实验组 GLU、CHOL、TC 含量与 NC 组相比均无显著差异($P>0.05$)。GPM 和 GPH 组的

表 2 秀珍菇粉对小鼠血清生化指标的影响

Table 2 Effects of *Pleurotus geesteranus* powder on serum levels of biochemical indices in mice

组别	ALT 活性/(IU/L)	GLU 含量/(mmol/L)	BUN 含量/(mmol/L)	Crea 含量/(μ mol/L)	CHOL 含量/(mmol/L)	TC 含量/(mmol/L)
NC 组	48.00 \pm 3.09	3.62 \pm 0.93	11.60 \pm 0.74	47.18 \pm 5.70	2.71 \pm 0.18	1.17 \pm 0.16
GPL 组	46.54 \pm 5.29	3.35 \pm 0.78	10.88 \pm 1.31	44.10 \pm 3.55	2.66 \pm 0.29	1.20 \pm 0.12
GPM 组	41.46 \pm 5.29**	3.22 \pm 0.73	9.90 \pm 1.14**	42.70 \pm 3.14*	2.68 \pm 0.35	1.16 \pm 0.16
GPH 组	41.34 \pm 2.79**	3.44 \pm 0.67	9.34 \pm 0.84**	41.93 \pm 3.68*	2.74 \pm 0.29	1.25 \pm 0.09

注:与 NC 组相比,*表示差异显著, $P<0.05$;**表示差异极显著, $P<0.01$ 。

ALT 活性极显著低于 NC 组($P<0.01$)。灌服秀珍菇粉明显降低小鼠血清中 BUN 和 Crea 含量,其中 GPM、GPH 组的 BUN 含量均与 NC 组差异极显著($P<0.01$);GPM 和 GPH 组的 Crea 含量与 NC 组相比显著降低($P<0.05$)。结果表明,小鼠灌服秀珍菇粉后,秀珍菇对肝、肾的功能具有一定保护作用。

2.3 秀珍菇粉对小鼠抗氧化能力影响

SOD、GSH-Px、CAT 活性和 MDA 含量是反映机体

抗氧化能力的重要指标,其中 SOD、GSH-Px 和 CAT 是机体重要的抗氧化酶,具有清除超氧化或过氧化因子自由基、保护生物膜和生物大分子免受损伤的作用^[21];MDA 是一种脂质过氧化物,其含量越高表明机体细胞受自由基攻击程度越严重^[22]。秀珍菇粉对小鼠血清、肝、肾组织抗氧化能力的影响见表 3。

由表 3 可知,GPM、GPH 组小鼠血清中 MDA 含量均极显著低于 NC 组($P<0.01$)。与 NC 组相比,GPM、

表 3 秀珍菇粉对小鼠血清、肝、肾组织抗氧化指标的影响

Table 3 Effects of *Pleurotus geesteranus* powder on the antioxidant activity in the serum, liver, and kidney of mice

组别	血清			肝			肾				
	MDA 含量/ (nmol/mL)	SOD 活性/ (U/mL)	GSH-Px 活 性/(U/mL)	MDA 含量/ (nmol/mg 蛋白)	SOD 活性/ (U/mL)	GSH-Px 活 性/(U/mL)	CAT 活性/ (U/mg 蛋白)	MDA 含量/ (nmol/mg 蛋白)	SOD 活性/ (U/mL)	GSH-Px 活 性/(U/mL)	CAT 活性/ (U/mg 蛋白)
NC 组	8.01 \pm 0.14	254.07 \pm 6.12	446.94 \pm 57.09	0.55 \pm 0.04	222.97 \pm 24.57	689.91 \pm 75.31	51.85 \pm 5.32	2.27 \pm 0.19	175.59 \pm 10.10	627.01 \pm 128.38	58.64 \pm 6.97
GPL 组	7.99 \pm 0.61	258.89 \pm 5.56	515.49 \pm 65.13*	0.49 \pm 0.06	224.88 \pm 16.21	693.96 \pm 76.54	57.21 \pm 7.78	2.02 \pm 0.10*	191.93 \pm 15.40	637.20 \pm 87.25	58.76 \pm 6.05
GPM 组	7.02 \pm 0.72**	262.27 \pm 5.17*	503.63 \pm 67.49	0.50 \pm 0.03	221.17 \pm 9.45	676.23 \pm 24.68	60.42 \pm 6.05*	1.56 \pm 0.14**	172.19 \pm 11.72	814.62 \pm 124.32*	57.04 \pm 3.79
GPH 组	7.02 \pm 0.57**	262.04 \pm 9.51*	490.04 \pm 40.38	0.52 \pm 0.05	214.14 \pm 17.88	660.13 \pm 53.09	59.91 \pm 1.91*	1.78 \pm 0.13**	179.39 \pm 8.42	759.64 \pm 87.96*	57.78 \pm 6.61

注:与 NC 组相比,*表示差异显著, $P<0.05$;**表示差异极显著, $P<0.01$ 。

GPH 组小鼠血清 SOD 活性显著升高($P<0.05$);GPL 组小鼠血清 GSH-Px 活性也显著高于 NC 组($P<0.05$)。灌服秀珍菇粉后,GPM 和 GPH 组小鼠肝 CAT 活性显著升高($P<0.05$),各实验组小鼠肾脏 MDA 含量显著低于 NC 组($P<0.05$, $P<0.01$),且 GPM 和 GPH 组小鼠肾 GSH-Px 活性也显著高于 NC 组($P<0.05$)。结果表明,秀珍菇粉能明显提高小鼠血清 SOD 活性、血清和肾 GSH-Px 活性以及肝 CAT 活性,并明显降低血清和肾 MDA 含量,体现出较好的抗氧化活性。此结果与前人对秀珍菇菌丝体和秀珍菇多糖及秀珍菇蛋白水解物抗氧化功效的研究报道一致^[10, 17, 23],说明秀珍菇粉的抗氧化活性与其所含的多糖和蛋白成分密切相关。但也不排除秀珍菇粉中其他的一些活性物质(如酚类化合物、维生素、番茄红素、氨基酸等)与多糖共同参与机体抗氧化过程^[24],起到协同增效作用。综上,秀珍菇作为

多种活性成分的复合体,较其单一多糖提取物具有更好的营养功能。

2.4 秀珍菇粉对小鼠免疫功能的影响

秀珍菇粉对小鼠免疫功能的影响见表 4。

表 4 秀珍菇粉对小鼠免疫功能的影响

Table 4 Effects of *Pleurotus geesteranus* powder on the immunity in mice

组别	胸腺指数/ (g/100 g)	脾指数/ (g/100 g)	T 淋巴细胞 刺激指数	B 淋巴细胞 刺激指数
NC 组	0.24 \pm 0.03	0.40 \pm 0.04	3.55 \pm 0.35	6.46 \pm 1.46
GPL 组	0.27 \pm 0.02*	0.39 \pm 0.05	3.53 \pm 0.47	5.37 \pm 1.24
GPM 组	0.27 \pm 0.02*	0.37 \pm 0.06	3.84 \pm 0.47	6.68 \pm 1.14
GPH 组	0.30 \pm 0.02**	0.35 \pm 0.04	4.15 \pm 0.36*	6.90 \pm 0.88

注:与 NC 组相比,*表示差异显著, $P<0.05$;**表示差异极显著, $P<0.01$ 。

胸腺指数、脾脏指数、T淋巴细胞刺激指数、B淋巴细胞刺激指数是反映机体免疫功能的重要指标,其中胸腺指数和T淋巴细胞刺激指数代表细胞免疫功能,脾脏指数和B淋巴细胞刺激指数可反映体液免疫功能。由表4可知,各实验组小鼠的胸腺指数均显著高于NC组($P<0.05, P<0.01$);GPH组的T淋巴细胞刺激指数最高,与NC组相比差异显著($P<0.05$)。秀珍菇可显著提高小鼠的胸腺指数,且在2000 mg/kg BW剂量下可显著提高小鼠T淋巴细胞刺激指数,说明秀珍菇具有一定的增强小鼠细胞免疫功能的作用。

2.5 秀珍菇粉对小鼠肠道菌群的影响

2.5.1 Alpha多样性分析

Alpha多样性是反映物种丰富度和均匀度的综合指标,包含chao1、observed_species、Shannon和Simpson 4个次级指数。其中指数chao1和observed_species主要反映样品中物种种类(operational taxonomic units, OTUs)的数目,Shannon和Simpson指数同时反映样品中物种种类的数目以及样品中不同种类的物种丰度的平均性或均匀性。

秀珍菇粉对小鼠结肠微生物Alpha多样性的影响见表5。

表5 秀珍菇粉对小鼠结肠微生物Alpha多样性影响
Table 5 Effects of *Pleurotus geesteranus* powder on Alpha diversity indices of the colonic flora in mice

组别	observed_species	Shannon	chao1	Simpson
NC组	1 648±165	7.65±0.43	2 639±247	0.985±0.012
GPL组	1 872±80*	8.37±0.32*	2 999±44*	0.986±0.002
GPM组	1 793±96	8.20±0.33	2 888±119	0.987±0.003
GPH组	1 707±79	8.03±0.14	2 816±13	0.985±0.002

注:与NC组相比,*表示差异显著, $P<0.05$;**表示差异极显著, $P<0.01$ 。

由表5可知,与NC组相比,各实验组的chao1、observed_species和Shannon指数均有所增加,GPL组的chao1、observed_species和Shannon指数均显著高于NC组($P<0.05$),GPM和GPH组的chao1、observed_species和Shannon指数与NC组无显著差异($P>0.05$)。

维恩图可直观反映不同样本之间共同的或特有的物种数(operational taxonomic units, OTUs)。基于OTUs聚类的维恩图见图1。

由图1可知,GPL、GPM、GPH组与NC组的小鼠肠道共同物种数(OTUs)分别为2 216、2 318和2 177,GPL、GPM、GPH组小鼠肠道的特有物种数(OTUs)均较NC组多,分别为NC组1.9、2.0倍和1.7倍,此结果进一步证实灌服秀珍菇粉能提高小鼠肠道菌群的多样性,增加肠道微生物菌群数量。

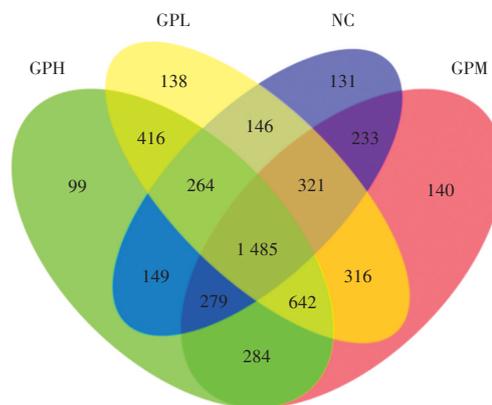
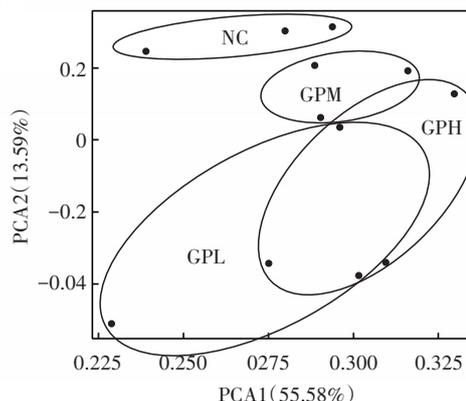


图1 基于OTUs聚类的维恩图

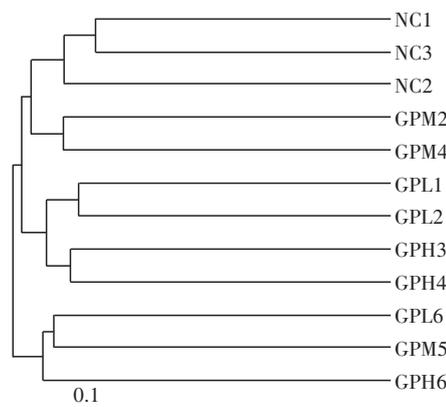
Fig.1 Venn diagram of OTUs in different groups

2.5.2 Beta多样性分析

通过主成分分析图和聚类分析树分析Beta多样性,结果见图2。



(a)主成分分析图



(b)聚类分析树

图2 主成分分析图和聚类分析树

Fig.2 Principal component analysis and UPGMA-based hierarchical clustering analysis

主成分分析图中组与组之间的距离远近代表组间相似程度的高低。由图2(a)可知,秀珍菇各剂量组(GPL、GPM和GPH)与NC组间均存在一定距离,GPL和GPH组距NC组较远,说明GPL和GPH组与NC

组的微生物菌群相似度较低,差异较大。聚类分析树也可反映样本间的相似程度,两个样本间分支距离越短,相似度越高。由图2(b)可知,3个正常对照组样本间分支距离较短,但正常对照组样本与实验组各样本间分支距离较长,此结果与主成分分析结果较为一致,进一步验证了灌服秀珍菇粉后,小鼠肠道的菌群结构发生了改变。

2.5.3 肠道菌群相对丰度分析

厚壁菌门和拟杆菌门为肠道优势菌门。厚壁菌门的许多成员都是有益菌,如乳酸杆菌可通过发酵产生乙酸盐改善胃肠道功能、抑制肠道内有害菌生长、提高机体免疫力等^[25]。研究表明,肠道菌群可对肠道中未

消化的碳水化合物进行酵解,产生的乙酸、丙酸、丁酸等短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFAs)对肠屏障功能的维护有重要作用^[26]。其中,厚壁菌门发酵代谢产生丁酸,拟杆菌门发酵产生丙酸,而丁酸的作用效果强于乙酸和丙酸,并且丁酸可以增加乳酸杆菌的数量、抑制大肠杆菌增殖^[27-28]。厚壁菌门下的毛螺菌科、梭菌科、优杆菌科等许多菌种均为产丁酸菌,被认为是潜在的有益菌。而拟杆菌门下普雷沃氏菌科的菌种可作为条件致病菌,引起牙周和牙齿、肠道炎症、类风湿性关节炎、细菌性阴道炎等问题^[29]。秀珍菇粉对小鼠肠道主要菌群相对丰度影响见表6。

由表6可知,在门水平下,GPM和GPH组小鼠的

表6 秀珍菇粉对小鼠肠道菌群相对丰度影响

Table 6 Effects of *Pleurotus geesteranus* powder on the relative abundance of intestinal flora at phylum and family levels in mice

组别	门水平					科水平					
	厚壁菌门	拟杆菌门	毛螺菌科	紫单胞菌科	瘤胃菌科	普雷沃氏菌科	脱硫弧菌科	未分类杆菌科	乳酸杆菌科	梭菌科	优杆菌科
NC组	60.10±	34.50±	41.95±	20.20±	11.24±	9.82±	1.60±	2.11±	0.63±	0.25±	0.09±
	3.33	2.69	5.51	3.12	1.39	0.66	0.19	0.20	0.21	0.07	0.03
GPL组	65.27±	28.06±	50.96±	18.74±	10.58±	3.18±	2.21±	1.84±	1.42±	0.87±	0.13±
	5.29	4.75*	5.81	2.98	0.91	1.95**	1.2	0.44	0.39*	0.44*	0.01
GPM组	67.26±	26.44±	46.23±	20.57±	13.00±	5.46±	2.84±	1.45±	1.15±	0.45±	0.20±
	4.18*	4.36**	8.63	3.68	0.42	1.59**	1.07	0.32*	0.55	0.32	0.09*
GPH组	67.51±	25.66±	54.23±	18.68±	11.29±	3.92±	3.14±	1.04±	0.69±	0.27±	0.20±
	1.82*	1.09**	4.73*	2.61	2.44	2.56**	0.16*	0.19**	0.24	0.12	0.07*

注:与NC组相比,*表示差异显著, $P<0.05$;**表示差异极显著, $P<0.01$ 。

厚壁门菌群丰度显著高于NC组($P<0.05$),而各实验组拟杆菌门菌群丰度显著低于NC组。在科水平下,厚壁菌门下的毛螺菌科、脱硫弧菌科、乳酸杆菌科、梭菌科和优杆菌科的菌群丰度与NC组相比,呈上升趋势,而拟杆菌门下有的普雷沃氏菌科和未分类杆菌科的菌群丰度呈现下降趋势。其中GPH组的毛螺菌科、GPL组的乳酸杆菌科、梭菌科以及GPM和GPH组的优杆菌科的菌群丰度均显著高于NC组($P<0.05$);而GPL、GPM、GPH组的普雷沃氏菌科和GPM、GPH组的未分类杆菌科的菌群丰度均显著低于NC组($P<0.01$, $P<0.05$)。

以上结果表明,秀珍菇粉可增加小鼠肠道菌群物种数量和多样性,显著增加厚壁菌门下有益菌群丰度,抑制有害菌群产生,对肠道菌群具有正向调控作用。

3 结论

本实验从抗氧化、增强免疫和调控肠道菌群等方面探讨秀珍菇营养功效,旨在为秀珍菇保健产品开发提供依据。结果表明,秀珍菇粉可提高小鼠血清、肝、肾抗氧化活性,增强小鼠细胞免疫功能,有效调节肠道菌群结构,具有较高的食用价值。秀珍菇抗氧化和增强免疫的机制可能源于其对肠道微生态的调控作用。

参考文献:

- 马传贵,张志秀,鲍文辉.食用菌多糖及其生物活性的研究进展[J].食药用菌,2021,29(3):196-201.
MA Chuangui, ZHANG Zhixiu, BAO Wenhui. Research progress on extraction and bioactivity of polysaccharides from edible mushrooms[J]. Edible and Medicinal Mushrooms, 2021, 29(3): 196-201.
- TÖRÖS G, EL-RAMADY H, PROKISCH J, et al. Modulation of the gut microbiota with prebiotics and antimicrobial agents from *Pleurotus ostreatus* mushroom[J]. Foods, 2023, 12(10): 2010.
- 赵明,陈香利,孔祥辉.食药用菌多糖益生元效应及其对肠道微生态系统影响的研究进展[J].食药用菌学报,2022,29(4):107-116.
ZHAO Ming, CHEN Xiangli, KONG Xianghui. Research progress on prebiotic effects of polysaccharides from edible and medicinal fungi and their effects on gut microecosystem[J]. Acta Edulis Fungi, 2022, 29(4): 107-116.
- GIANNENAS I, TONTIS D, TSALIE E, et al. Influence of dietary mushroom *Agaricus bisporus* on intestinal morphology and microflora composition in broiler chickens[J]. Research in Veterinary Science, 2010, 89(1): 78-84.
- 李好,于世军,王伟,等.富硒猴头菇对小鼠肠道菌群的调节作用[J].中国微生态学杂志,2010,22(8):697-700.
LI Hao, YU Shijun, WANG Wei, et al. Regulation of selenium-enriched *Hericium erinaceu* on intestinal microflora in mice[J]. Chinese Journal of Microecology, 2010, 22(8): 697-700.
- 王春晖,陈海强,胡汝晓,等.香菇酶解物对小鼠免疫及肠道菌群的影响研究[J].微生物学通报,2012,39(6):820-826.

- WANG Chunhui, CHEN Haiqiang, HU Ruxiao, et al. The effect of enzymatic hydrolysate of *Lentinula edodes* on the immunity and intestinal flora in mice[J]. Microbiology China, 2012, 39(6): 820-826.
- [7] 赵睿秋, 马高兴, 杨文建, 等. 6种食用菌子实体水提物对肠道菌群的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(5): 116-121.
- ZHAO Ruiqiu, MA Gaoxing, YANG Wenjian, et al. Effects of water extracts from six different species of edible mushroom on intestinal microorganisms in humans[J]. Food Science, 2017, 38(5): 116-121.
- [8] 刘凌云, 周宇, 陈华, 等. 秀珍菇研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(11): 3650-3657.
- LIU Lingyun, ZHOU Yu, CHEN Hua, et al. Research progress of *Pleurotus geesteranus*[J]. Microbiology China, 2020, 47(11): 3650-3657.
- [9] 张晓玉, 张博, 辛广, 等. 秀珍菇营养成分、生物活性及贮藏保鲜的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(6): 2314-2319.
- ZHANG Xiaoyu, ZHANG Bo, XIN Guang, et al. Research progress on nutrition constituents, bioactivity and storage preservation of *Pleurotus geesteranus*[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2016, 7(6): 2314-2319.
- [10] SONG X L, SHEN Q, LIU M, et al. Antioxidant and hepatoprotective effects of intracellular mycelium polysaccharides from *Pleurotus geesteranus* against alcoholic liver diseases[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 114: 979-988.
- [11] SONG X L, LIU Z H, ZHANG J J, et al. Anti-inflammatory and hepatoprotective effects of exopolysaccharides isolated from *Pleurotus geesteranus* on alcohol-induced liver injury[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 10493.
- [12] LIANG Z H, YIN Z H, LIU X P, et al. A glucomannogalactan from *Pleurotus geesteranus*: Structural characterization, chain conformation and immunological effect[J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 287: 119346.
- [13] SUN Y J, ZHOU C, HUANG S C, et al. Selenium polysaccharide SPMP-2a from *Pleurotus geesteranus* alleviates H₂O₂-induced oxidative damage in HaCaT cells[J]. BioMed Research International, 2017, 2017: 1-9.
- [14] SONG X L, ZHANG J J, LI J A, et al. Acetylated polysaccharides from *Pleurotus geesteranus* alleviate lung injury via regulating NF- κ B signal pathway[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(8): 2810.
- [15] 吕建敏, 龚金炎, 刘士旺. 秀珍菇粉对 H22 荷瘤小鼠体内抗肿瘤作用研究[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(2): 216-223.
- LYU Jianmin, GONG Jinyan, LIU Shiwang. Anti-tumor activities of *Pleurotus geesteranus* fruit body powder on H22 tumor-bearing mice[J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2020, 28(2): 216-223.
- [16] JIN M H, XIE Y, XIE P L, et al. Physicochemical and functional properties of *Pleurotus geesteranus* proteins[J]. Food Research International, 2022, 162: 111978.
- [17] LIAO X Y, ZHU Z J, WU S J, et al. Preparation of antioxidant protein hydrolysates from *Pleurotus geesteranus* and their protective effects on H₂O₂ oxidative damaged PC12 cells[J]. Molecules, 2020, 25(22): 5408.
- [18] 高歌, 包海鹰, 图力古尔. 纳米级灵芝子实体粉末和破壁灵芝孢子粉体外抗肿瘤活性研究[J]. 菌物学报, 2013, 32(1): 114-127.
- GAO Ge, BAO Haiying, BAU Tolgor. Anti-tumor activity of the nano-scale fruiting body powder and the wall-broken spore powder of *Ganoderma lucidum* in vitro[J]. Mycosystema, 2013, 32(1): 114-127.
- [19] WU Y, ZHU C P, ZHANG Y, et al. Immunomodulatory and antioxidant effects of pomegranate peel polysaccharides on immunosuppressed mice[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 137: 504-511.
- [20] LI Y S, KANDHARE A D, MUKHERJEE A A, et al. Acute and sub-chronic oral toxicity studies of hesperidin isolated from orange peel extract in Sprague Dawley rats[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2019, 105: 77-85.
- [21] ARMSTRONG D, BROWNE R. The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory[M]//ARMSTRONG D. Free Radicals in Diagnostic Medicine. Boston:Springer, 1994: 43-58.
- [22] HALLIWELL B, CHIRICO S. Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 1993, 57(5): 715S-725S.
- [23] 吴俐, 沈恒胜, 陈君琛, 等. 富硒秀珍菇菌粉的抗氧化作用及其安全性初步研究[J]. 福建农业学报, 2015, 30(2): 163-167.
- WU Li, SHEN Hengsheng, CHEN Junchen, et al. Antioxidant and acute toxicity of Se-enriched *Pleurotus geesteranus* singer mycelia[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2015, 30(2): 163-167.
- [24] SÁNCHEZ C. Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2017, 2(1): 13-22.
- [25] 王涵, 刘倩, 郭子晨, 等. 合生元制剂对小鼠抗氧化能力和肠道菌群的影响[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(7): 1-8.
- WANG Han, LIU Qian, GUO Zichen, et al. Effects of synbiotics on antioxidant capacity and intestinal flora in mice[J]. Food Research and Development, 2022, 43(7): 1-8.
- [26] WANG W, LI Q A, CHAI W H, et al. *Lactobacillus paracasei* J1us66 extenuate oxidative stress and inflammation via regulation of intestinal flora in rats with non alcoholic fatty liver disease[J]. Food Science & Nutrition, 2019, 7(8): 2636-2646.
- [27] BIANCHI F, DALL'ASTA M, DEL RIO D, et al. Development of a headspace solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometric method for the determination of short-chain fatty acids from intestinal fermentation[J]. Food Chemistry, 2011, 129(1): 200-205.
- [28] 任吴疆, 张静, 霍清, 等. 鼠李糖乳杆菌 R9639 对小鼠肠道菌群及抗氧化能力的影响[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(13): 1-8.
- REN Wujiang, ZHANG Jing, HUO Qing, et al. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* R9639 on intestinal flora and anti-oxidation capacity of mice[J]. Food Research and Development, 2022, 43(13): 1-8.
- [29] ULGER TOPRAK N, DUMAN N, SACAK B, et al. *Alloprevotella* rava isolated from a mixed infection of an elderly patient with chronic mandibular osteomyelitis mimicking oral squamous cell carcinoma[J]. New Microbes and New Infections, 2021, 42: 100880.

加工编辑:张昱

收稿日期:2023-09-26