

苦荞饮食对自发性高血压大鼠肠道菌群的影响

蔡光泽¹, 蔡兴勇², 王安虎¹, 刘新宇³

(1. 西昌学院, 四川 西昌 615013; 2. 西昌市农牧局, 四川 西昌 615000;

3. 四川大学生物治疗国家重点实验室, 成都 610041)

摘要: [目的] 研究苦荞饮食对自发性高血压大鼠肠道菌群的影响。[方法] 将10只自发性高血压大鼠(Spontaneously Hypertensive Rats, SHR)随机分成常规饮食对照组和苦荞饮食组, 对照SHR(SHR-C)正常饮食, 苦荞饮食组SHR(SHR-TBW)全荞麦饮食, 第3、6和12周无菌收集SHR粪便样本, 16S rDNA V3-V4区扩增, Hiseq高通量测序后进行比对和分类。[结果] SHR-C和SHR-TBW大鼠肠道菌群结构及组成多样性有显著性的差异。随时间厚壁菌门/拟杆菌门(Firmicutes/Bacteroidetes, F/B)值从0.22增加到1.89; 未知不可分类的菌群从16.52%增加到50.65%; Allobaculum、丁酸弧菌属、毛螺菌属和变形菌菌属是SHR-TBW饮食的优势菌群。[结论] 苦荞饮食能重构高血压肠道菌群, 饮食干预可有效改善血压。

关键词: 苦荞饮食; 自发性高血压; 大鼠肠道菌群

中图分类号: TS201.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1891(2018)03-0011-04

On Effect of Tartary Buckwheat Diet on Gut Microbiota in Spontaneously Hypertensive Rats

CAI Guang-ze¹, CAI Xing-yong², WANG An-hu¹, LIU Xin-yu³

(1. Xichang University, Xichang, Sichuan 615013, China;

2. Xichang Agriculture and Animal Husbandry Bureau, Xichang, Sichuan 615000, China;

3. State Key Laboratory of Biotherapy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: [Objective] This paper aims to study the effects of tartary buckwheat diet on intestinal flora in spontaneously hypertensive rats. [Methods] Ten spontaneously hypertensive rats (SHR) were randomly divided into two groups: the control group and the tartary buckwheat diet group. Control SHR (SHR-C) normal diet, Tartary Buckwheat diet group SHR (SHR-TBW) full buckwheat diet. The stool samples of SHR were collected aseptically at the 3rd, 6th and 12th weeks, and the 16S rDNA V3-V4 region was amplified. Then, they were compared and classified after the Hiseq high throughput sequencing. [Results] There were significant differences in the structure and composition of intestinal flora between SHR-C and SHR-TBW rats. The Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) value increased from 0.22 to 1.89, the unknown and non-classified flora increased from 16.52% to 50.65%, and Allobaculum, Vibrio butyricum, Trichomonas and Proteus were the dominant flora in the SHR-TBW diet. [Conclusion] Tartary buckwheat diet can reconstruct intestinal flora of hypertension, and dietary intervention can effectively improve blood pressure.

Keywords: tartary buckwheat diet; spontaneously hypertensive; intestinal flora in rats

高血压是全球最常见的心血管疾病。1937年, Morse等^[1]研究结果表明, 四川省凉山地区彝族人血压维持在较低水平且不随年龄增长而升高或只是轻微升高。1979年, 吴德诚等^[2]对普格县彝族农民的调查证实了Morse的研究结果。吴天一等^[3]抽样调查发现, 同一地区不同民族间和不同地区同一民族间高血压标化患病率存在差异。1991年

第三次全国高血压抽样调查也显示^[4], 患病率最低为彝族(3.28%), 较高依次为朝鲜族(22.95%)、藏族(21.04%)、蒙古族(20.22%)。中国流行病学的先驱和奠基人何观清教授根据全国(1958—1959年、1979—1980年)高血压流行病学调查结果表明, 影响彝族人血压的主要因子是环境因素, 包括当地的社会经济因素、居民膳食结构、体力活动等, 未发现

收稿日期: 2018-02-28

基金项目: 四川省麦类作物育种攻关项目(2016NYZ0030); 国家现代农业产业体系荞麦育种岗位专项资金(CARS-06-A4)。

作者简介: 蔡光泽(1963—), 男, 四川巴中人, 教授, 博士, 研究方向: 作物育种栽培、生物化学与分子生物学。

与遗传因素的显著关联^[5-6]。遗传流行病学与移民流行病学研究表明彝族移民和彝族原住农民有着相同的遗传背景,但移居到城镇后生活方式和膳食结构发生改变,因此环境因素的改变是影响彝族移民血压的最主要因素。苦荞、土豆和玉米几千年来都是彝族人的主食,尽管彝族人平常还食用燕麦等小众粮食作物,但现有的研究不足以支持长期土豆、玉米加上零星的燕麦饮食能降低血压这种观点。这提示以苦荞为主食的彝族人膳食结构对低的高血压发病率起到直接作用。

肠道菌群是生物体的第二基因组,不断深入的研究表明肠道菌群不只在消化过程发挥作用,它和宿主健康有着极为密切的联系。相关研究^[7]显示在SHR和药物诱导高血压大鼠的肠道菌群结构都发生显著改变,表现为菌群的丰度、多样性、均一度降低,而F/B升高。Adnan等^[8]也发现,接受来自高血压大鼠肠道菌群的抗生素处理大鼠血压升高了。中国医学科学院阜外医院高血压中心蔡军等^[9]发文揭示高血压与肠道菌群的关系,阐述了肠道菌群平衡对维持血压的重要性,也为高血压的治疗提供了新思路——可以通过饮食干预等方式,重构高血压患者肠道菌群,从而达到治疗的目的。研究表明^[10]不同遗传背景的人对相同的膳食响应可能不同,并且跟个人的肠道菌群有着极大的联系。尽管有研究表明苦荞饮食能降低SHR血压,但苦荞通过对SHR肠道菌群的影响降低血压,未见报道。因而,本研究通过SHR模型,阐释苦荞饮食对SHR肠道菌群的影响,以期对高血压等心血管疾病食疗提供一些有益的参考。

1 实验材料与方法

1.1 实验动物

选用由北京维通利华实验动物技术有限公司提供的健康状况良好,清洁级、11周龄自发性高血压大鼠10只,合格证号:SCXK(京)2012-0001。饲养于四川大学SPF级实验动物中心,饲养温度20~25℃,湿度40%~60%,光照节律:06:00:00—18:00:00,保持通风良好。动物适应一周后(12周龄)开始实验。

1.2 仪器和试剂

SoftronBP-98A型大鼠智能无创尾动脉血压测量仪(北京软隆科技有限责任公司);SIGMA 1-15PK高速离心机(北京五洲东方科技发展有限公司)。苦荞粉购自凉山州邛都苦荞制品有限责任公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组

10只SHR大鼠随机分成2组,适应性喂养7d经血压、体重测量后,根据收缩压、体重差异采用拉丁方分组法将其分为常规饮食对照组和苦荞饮食干预组,每组5只。饮食干预试验开始后第3、6和12周收集大鼠粪便。

1.3.2 血压测量

采用智能Softron-98A型大鼠无创尾动脉测压仪,测量大鼠尾动脉收缩压时,测量大鼠血压的操作间温度保持在22℃,室内保持安静。测量时先将智能无创血压仪的主机与电脑相连,并依据所要测量大鼠的大小,挑选合适的鼠袋;调试无创血压仪主机上的温度设置,确使鼠袋内部的保温桶保持在39℃;将大鼠固定在鼠袋之中时,动作一定要轻柔,尽量使大鼠保持安静。在鼠袋预热15min后,无创血压仪主机及电脑自动开启测量模式,每只大鼠连续测量3次取其平均值,并记录测量结果。因大鼠的血压,易受环境状态、温度高低等影响,所以测量时应在同一条件下进行,这样才能做到一致。测量时间固定在13:00—15:00。每2周测一次血压。

1.3.3 大鼠粪便菌群基因组DNA的提取与PCR扩增

采用Stool DNA Kit抽提大鼠粪便DNA,步骤按照说明书进行。完成基因组DNA抽提后,利用1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组DNA完整性。采用细菌16S rRNA(V3+V4)区域引物:5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3'; 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'。PCR反应条件为:95℃ 5min; 25个循环包括95℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 40s; 72℃ 7min,至4℃停止。每个样品的PCR产物混合后用2%琼脂糖凝胶电泳检测,上样量3μL。

1.3.4 生物信息学分析

PCR产物采用His-seq高通量测序平台进行测序。高质量序列的提取:His-seq测得到的PE reads首先根据overlap关系进行拼接,将成对的reads拼接成1条序列,同时对reads质量和merge的效果进行质量控制和过滤,去除序列末端的引物和接头序列、多碱基N、polyA/T尾巴及低质量碱基;去除所得到的barcode标签序列、前引物序列以及长度短于200bp、模糊碱基数大于0、序列平均质量低于20的序列。

操作单元(Operational Taxonomic Units, OTU)聚类分析:提取非重复序列,使用QIIME分析平台进行序列的生物信息学分析,与Silva数据库已比对

的16S核糖体序列数据库进行比对,对相似性大于97%以上的序列进行归并,生成分类结果。进行alpha和beta多样性计算,采用Chao、Shannon评估指数分别对样本进行多样性分析。根据Silca数据库已有的参考序列对OUT进行种属鉴定。

1.3.5 数据统计分析

采用R软件进行绘图分析,数据采用SPSS16.0统计软件进行统计和分析。

2 实验结果

2.1 SHR一般情况比较

常规饮食组和苦荞饮食干预组动物生长良好,饮水、进食、活动正常。

2.2 SHR体质量变化

从体质量来看,在第3和第6周时,常规饮食组与苦荞饮食组体质量差异不明显;在第12周时,常规饮食组与苦荞饮食组体质量存在显著性差异(mean \pm SD, $p < 0.001$),苦荞饮食组体质量平均减少了9.6%(图1)。

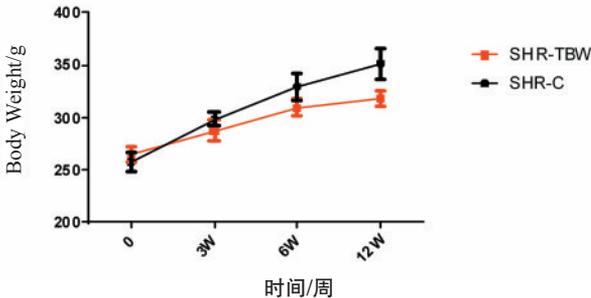


图1 苦荞饮食对SHR体重的影响

2.3 SHR血压变化

和SHR-C相比较,SHR-TBW大鼠血平均压显著性下降(mean \pm SD, $p < 0.001$)。在第3周时,和SHR-C相比,平均血压下降了11.03%;第6周时下降了18.84%;第12周时下降了25.64%。

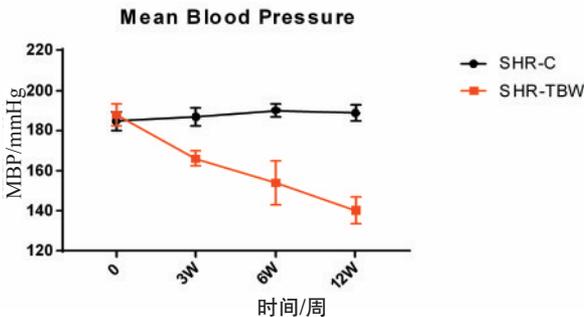


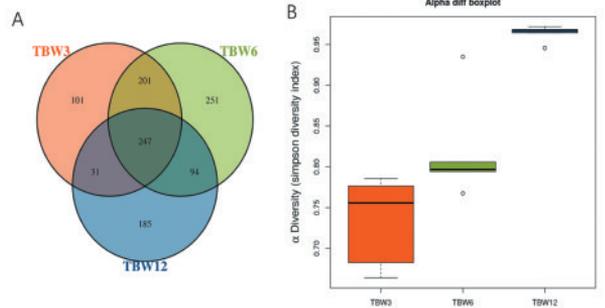
图2 苦荞饮食干预显著性降低了SHR平均血压

2.4 苦荞饮食干预对SHR肠道菌群的影响

2.4.1 苦荞饮食对SHR肠道菌群多样性影响分析

OTU(Operational Taxonomic Units:操作分类单

元)是为了便于生物信息统计分析,将所有序列归类操作成多个小组,即通常在相似度97%水平上聚类成可操作分类单元(OTU)。通过对样本进一步的多样性分析,使用统计学分析指数分析群落的物种多样性和丰富度,包括菌群丰度指数(Chao、Ace)、菌群多样性指数(Shannon、Simpson)、测序深度指数(Coverage),其中Shannon则是用来估测样本中微生物的多样性指数之一,Shannon指数的数值与微生物多样性成正比,其值越大,说明微生物群落多样性越大。从图3A中可以看出:随着TBW饮食时间延长,SHR-TBW的OTU数目得到显著性提高,即OTU数增多;从Shannon指数来看,SHR-TBW的Shannon指数增加,也就是苦荞饮食干预后,SHR-TBW大鼠菌群微生物多样性得到提高。



TBW3:TBW干预第3周;TBW6:TBW干预第6周;TBW12:TBW干预第12周。

图3 苦荞饮食对SHR肠道菌群多样性的影响

2.4.2 苦荞饮食对SHR肠道菌群结构多样性影响分析

门水平上肠道菌群结构的变化在正常人体粪便中存在着四大主要的细菌门,包括厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)以及放线菌门(*Actinobacteria*)。从图4(封二)中可以看出,苦荞饮食干预后,SHR肠道菌群四大菌在门水平上的丰度发生了变化,其中厚壁菌门和拟杆菌门的丰度改变最为明显,这就说明,苦荞饮食会改变SHR肠道菌群的菌群结构。

在四大主要菌门中,厚壁菌门和拟杆菌门在肠道中占绝对优势,因此二者的比值(F/B)从0.22上调至1.89,能够很好地反应菌群在门水平上结构的改变。

在属水平上,肠道菌群结构的变化明显。如图5(封二)所示,苦荞饮食干预后,随时间改变SHR肠道菌群结构变化较为明显的部分菌属依次为普氏菌属(*Prevotella*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、甲烷粒菌属(*Methanocorpusculum*)、毛螺菌属(*Lachnospiracea_incertae_sedis*)、*Allobaculum*、陶厄氏菌(*Thauera*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)以及变形

杆菌属(*Proteus*)。

3 讨论

高血压是多因素疾病,发病机制复杂,为环境与遗传共同作用的结果,是一种最常见的慢性非传染病,已成为心、脑血管疾病和肾病等慢性疾病最重要的危险因素,促使罹患心血管疾病的风险和全因死亡率增加,其流行已成为全球重要的公共卫生挑战^[11-12]。2013 年全球约 1 000 万死亡及 8.5% 的寿命损失(伤残调整寿命年)可归因于高血压,位列所有健康危险因素第二位。在我国,约 250 万死亡(占总死亡的 28%)和 15% 的寿命损失可归因于高血压,是仅次于不合理膳食的第二位健康危险因素^[13]。Lewington 等^[14]中国 50 万人高血压调查新数据表明:我国高血压患病率高达 32.5%,控制率仅仅 4.2%。这是自我国 1957 年第一次普查以来患病率最高的数据。研究高血压发病诱因及调控机制,对于明确疾病诊断,控制血压,减轻靶器官损害及改善预后有重要的意义。肠道菌群组成变化和功能失调与包括高血压在内的多种慢性病的发生、发展密切相关,通过调控肠道菌群来维持健康成为目前研究热点^[7-9],抗生素、饮食、宿主遗传和细菌

之间的作用是调控肠道菌群功能组成四大因素。其中膳食营养是影响肠道菌群结构和功能最为重要的,也较为迅速的因素,并由此影响宿主的代谢状况^[15]。高脂等不健康饮食习惯会引起肠道菌群的失调,使肠道通透性增加,形成全身的慢性、低水平炎症,进一步破坏胰岛素的信号转导通路,最终导致包括胰岛素抵抗、肥胖、糖尿病和高血压等在内的代谢综合征的发生^[16-18]。高纤维饮食、富含多酚饮食并辅以蔬菜水果等进行干预,在保证足够的人体营养基础上,又保证肠道菌群的“营养健康”,就可以改善由高脂饮食导致的菌群失调并改善由此带来的代谢失衡等慢性疾病。在食物—肠道菌群—代谢这条通路中到底存在着一种怎样的调控血压机制,针对高血压低发人群彝族人的饮食结构,本研究做了前瞻性的研究,并获得了一些有益的结果:苦荞饮食可以降低自发性高血压大鼠的血压,同时自发性高血压大鼠的体质量也发生了显著性变化,肥胖是包括高血压在内的很多疾病的诱因,肥胖与肠道菌群功能失调密切相关,苦荞饮食是否是通过热量限制调控体质量从而降低了血压?是需要我们进一步研究来破解苦荞饮食对血压调控的机制。

参考文献:

- [1] MORSE W R M, LL D. Blood Pressure Amongst Aboriginal Ethnic Groups of Szechwan Province, West China[J]. *The Lancet*, 1937(229):966-968.
- [2] 吴德诚. 凉山彝族农民血压调查报告[J]. *中华心血管病杂志*, 1981(9):2.
- [3] 吴天一. 我国部分民族及高原地区高血压调查的综合报告[J]. *中华心血管病杂志*, 1984(12):1-4.
- [4] 全国 1991 年高血压抽样调查领导小组. 全国 1991 年高血压抽样调查数据册[Z]. 1993.
- [5] HE J, Migration, Blood Pressure Pattern, and Hypertension: The Yi Migrant Study[J]. *Am J Epidemiol*, 1991(134):1085-1101.
- [6] HE J, TELL G S Effect of Migration on Blood Pressure: The Yi People Study[J]. *Epidemiology*, 1991(2):88-97.
- [7] YANG T. Gut Dysbiosis is Linked to Hypertension[J]. *Hypertension*, 2017(65):1331-1340.
- [8] ADNAN S. Alterations in the Gut Microbiota Can Elicit Hypertension in Rats[J]. *Physiol Genomics*, 2017(49):96-104
- [9] LI J. Gut Microbiota Dysbiosis Contributes to the Development of Hypertension[J]. *Microbiome*, 2017(5):14.
- [10] ZEEVI D. Personalized Nutrition by Prediction of Glycemic Responses[J]. *Cell*, 2015(163):1079-1094.
- [11] WHELTON P K. Epidemiology of hypertension[J]. *Lancet*, 1994(344):101-106.
- [12] COLLABORATION N C D R F. Worldwide Trends in Blood Pressure From 1975 to 2015: A Pooled Analysis of 1479 Population-Based Measurement Studies With 19.1 Million Participants[J]. *Lancet*, 2017(389):37-55.
- [13] COLLABORATORS G B D R F. Global, Regional, and National Comparative Risk Assessment of 79 Behavioural, environmental and Occupational, and Metabolic Risks or Clusters of Risks in 188 Countries, 1990-2013: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2013[J]. *Lancet*, 2015(386):2287-2323.
- [14] LEWINGTON S. The Burden of Hypertension and Associated Risk for Cardiovascular Mortality in China[J]. *JAMA Intern Med*, 2016(176):524-532.
- [15] SCHROEDER B O. BACKHED F. Signals from the Gut Microbiota to Distant Organs in Physiology and Disease[J]. *Nat Med*, 2016(22):1079-1089.
- [16] 张晨虹, 张烽. 膳食营养与肠道微生物组[J]. *生命科学*, 2017(29):12.

(4)政府对突破性创新的财政补贴。以上三点是我们通过演化与博弈计算出来的有效改进企业双方联盟知识共享的改进方案,企业间要想达到预期的知识共享合作效益,紧靠企业双方是很难实现的,要想达到突破性创新的联盟知识共享,笔者认为还需要政府的支持。除了我们要对于非知识联

盟方指定惩罚措施,还要对积极响应联盟知识共享的企业的一些奖励,特别是对于合作方式创新化,分享知识创新化,技术共享创新化这些不断进行改革和创新的企业,政府要给与大力的支持,促进所有企业不仅要知识合作分享,还要不断突破现有模式与知识,要不断研发新的模式技术和知识。

参考文献:

[1] 蒋维平,王琦琦,黄文龙.技术创新联盟网络对企业创新绩效的影响机理——企业如何借助联盟能力提升绩效? [J].科技管理研究,2017,7(7):123-129.

[2] 雷宏振,王刚,研发联盟企业间知识共享的演化博弈分析[J].现代情报,2013,33(11):33-37.

[3] 刘化霖.基于战略联盟的组织间学习研究[D].北京:首都经贸大学,2004.

[4] Marlena Le ó n Mendozaa, Juan Pablo Ortega Santosb, CHRISTIAN A, et al. Strategic Alliances in Higher Education in Ecuador: the Challenge of Knowledge Transfer and Its Effect on the Learning Curve[J]. Suma De Negocios, 2014, 5(12):96-104.

[5] 薛克雷,潘郁,叶斌,等.产学研协同创新信任关系的演化博弈分析[J].科技管理研究,2014,34(21):11-16.

[6] SUDHA M, LUO Xue-ming. Product Alliances, Alliance Networks, and Shareholder Value: Evidence from the Biopharmaceutical Industry[J]. International Journal of Research in Marketing, 2015, 32(1):9-22.

(责任编辑:蒋召雪)

(上接第14页)

[17] CARMODY R N. Diet Dominates Host Genotype in Shaping the Murine Gut Microbiota[J]. Cell Host Microbe, 2015(17): 72-84.

[18] MURPHY E F. Composition and Energy Harvesting Capacity of the Gut Microbiota: Relationship to Diet, Obesity and Time in Mouse Models[J]. Gut, 2010, 59:1635-1642.

(责任编辑:曲继鹏)