




读书报告

THESIS DEFENSE POWERPOINT TEMPLATE

 汇报人：胡文攀

 时间：2018.12.9



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharm



Effects of a homogeneous polysaccharide from Sijunzi decoction on human intestinal microbes and short chain fatty acids *in vitro*

Beibei Gao, Ruijun Wang, Ying Peng, Xiaobo Li*

School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, No. 800 Dongchuan Road, Minhang District, Shanghai 200240, China



IF=3.4

目录

CONTENTS



研究背景与意义

选题背景
研究意义
国内外相关研究综述
理论基础与文献综述
主要贡献与创新



研究思路与方法

研究思路
研究方法
研究方案可行性说明



研究结果

研究目标
成果形式
应用前景



结论

问题评估
相关对策
研究总结
成绩与思考

01 背景与意义

01 背景与意义

四君子汤（人参、白术、茯苓、甘草）是中医健脾补气的经典方剂，此外还具有免疫调节、降血压、抗肿瘤、抗炎和抗衰老等功效。从四君子汤中提取的均质多糖S-3-1具有增强免疫的活性，也是该方剂含量最丰富且起主要功效的物质。由于多糖分子量大，其体内代谢途径和机制复杂。目前，用于研究多糖降解的体外模型大多**局限于单一环境**，没有考虑**口服后胃肠道的整个过程**。

本研究目的：通过研究S-3-1对人体肠道微生物结构及代谢产物的影响，了解其免疫调节作用。



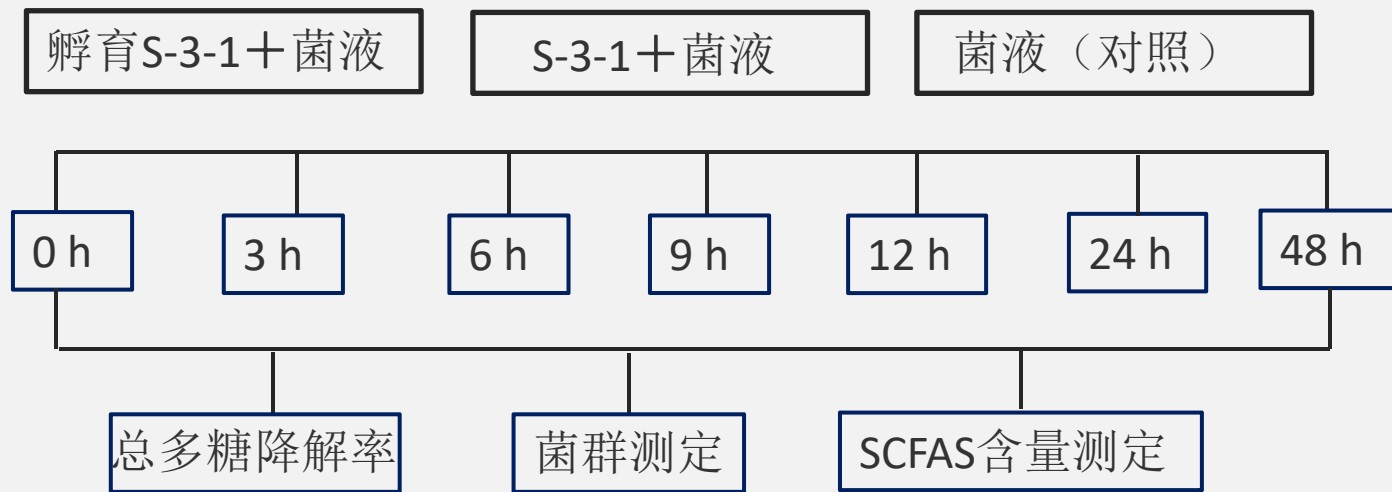
02 研究思路与方法

- ✓ 研究思路
- ✓ 研究方法
- ✓ 研究方案可行性说明

02 材料与方法

四君子汤 → 匀质多糖 → S-3-1 → 人工胃肠液 → 孵育S-3-1

粪菌悬液 + GAM培养基 → 厌氧培养 → 过滤 → 菌液



材料与amp;方法:

■ 多糖提取

以重量比3:3:3:2的四味药材配制四君子汤，并进行均相多糖S-3-1的制备:

- 1、干燥的草药在蒸馏水中煮两次，浓缩到1g/mL。
- 2、将上清离心，加入乙醇沉淀粗多糖。
- 3、采用离心法收集沉淀，Sevage法脱蛋白。
- 4、用氯仿和正丁醇(4:1)剧烈震荡粗多糖沉淀5次，依次用乙醇、丙酮和醚洗涤。
- 5、用蒸馏水将总多糖溶解。0.45mm滤膜过滤，放入DEAE-52纤维素色谱柱中，分别用去离子水0.1M NaCl、0.2M NaCl、0.3M NaCl洗脱，流速1mL/min。将保留时间为4min的洗脱液，浓缩干燥，回收残渣命名为S-3-1。

■ 多糖降解率测定（稳定性）

人工胃液：0.046M HCl，含胃蛋白酶400mg, pH 1.5

人工肠液：0.05M KH₂PO₄，含胰蛋白400mg, pH 6.8

40mL S-3-1 (1mg/mL)孵育于等体积人工胃液或肠液中，37° C 水浴。分别在0、1、2、4、6h取0.8mL的混合溶液，立即用3mL水饱和正丁醇淬灭，用苯酚-硫酸法测定0.4mL溶液中多糖浓度，用DNS法测定0.4mL溶液中还原糖浓度。

多糖降解率：

$$D\% = \frac{[I\% - (T - R)\%]}{I\%} \times 100\%$$

（其中D为降解速率；I为初始多糖浓度；T为总多糖浓度；R是还原糖的浓度）

■ 肠道菌群及SCFAS含量的测定

将粪便样品与25倍体积的GAM肉汤混合均匀。沉淀物用纱布过滤除去。37° C厌氧培养，混合气体 (H₂ 5%, CO₂ 10% N₂ 85%)。S3-1 和孵育后的分别与菌液在相同体积下混合。对照组，只包含GAM和人类粪便。在孵化过程中，各个时间点取3份样品，反应各点立即用3倍的水饱和正丁醇中止，测定人体肠道菌群组成及SCFA含量。

SCFAS:

- 1、0.2mL 硫酸(50%)和1mL内标溶涡流震荡1min。
- 2、加入0.8mL粪菌悬液上清，4° C 12000 rpm，10min，后用乙醚萃取。气相色谱仪(GC - 2010)，色谱柱DB-FFAP (30m*0.25mm*0.25μm)。

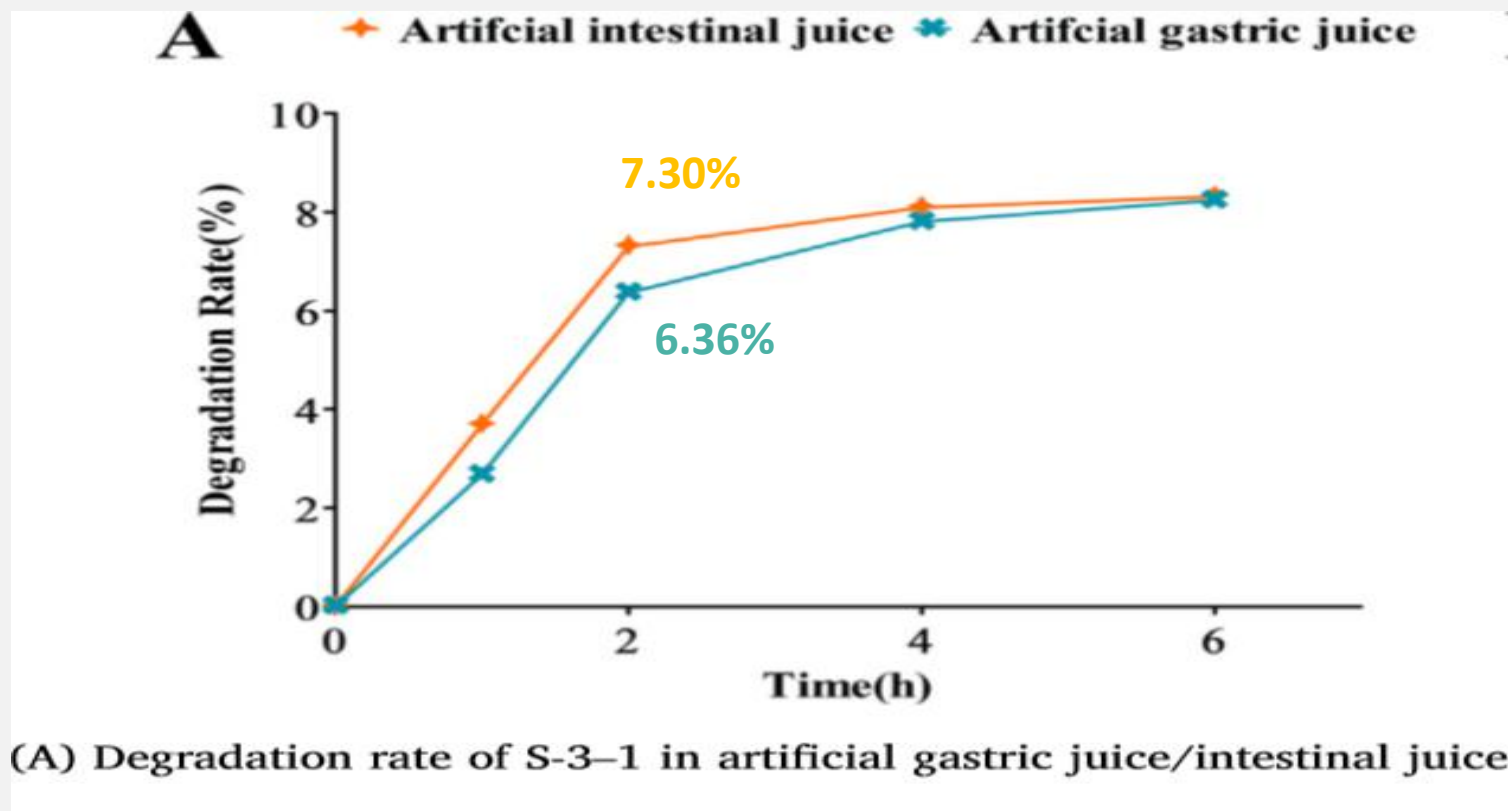
GAM:

酪蛋白色氨酸(17.0g/L)、大豆蛋白胨(3.0g/L)、葡萄糖(6.0g/L)、巯基乙酸钠(0.5g/L)、亚硫酸钠(0.1g/L)、氯化钠(2.5g/L)、白藜芦醇(0.001g/L)、L-半胱氨酸(0.25g/L)和**琼脂**(0.7g/L)组成。

03 研究结果

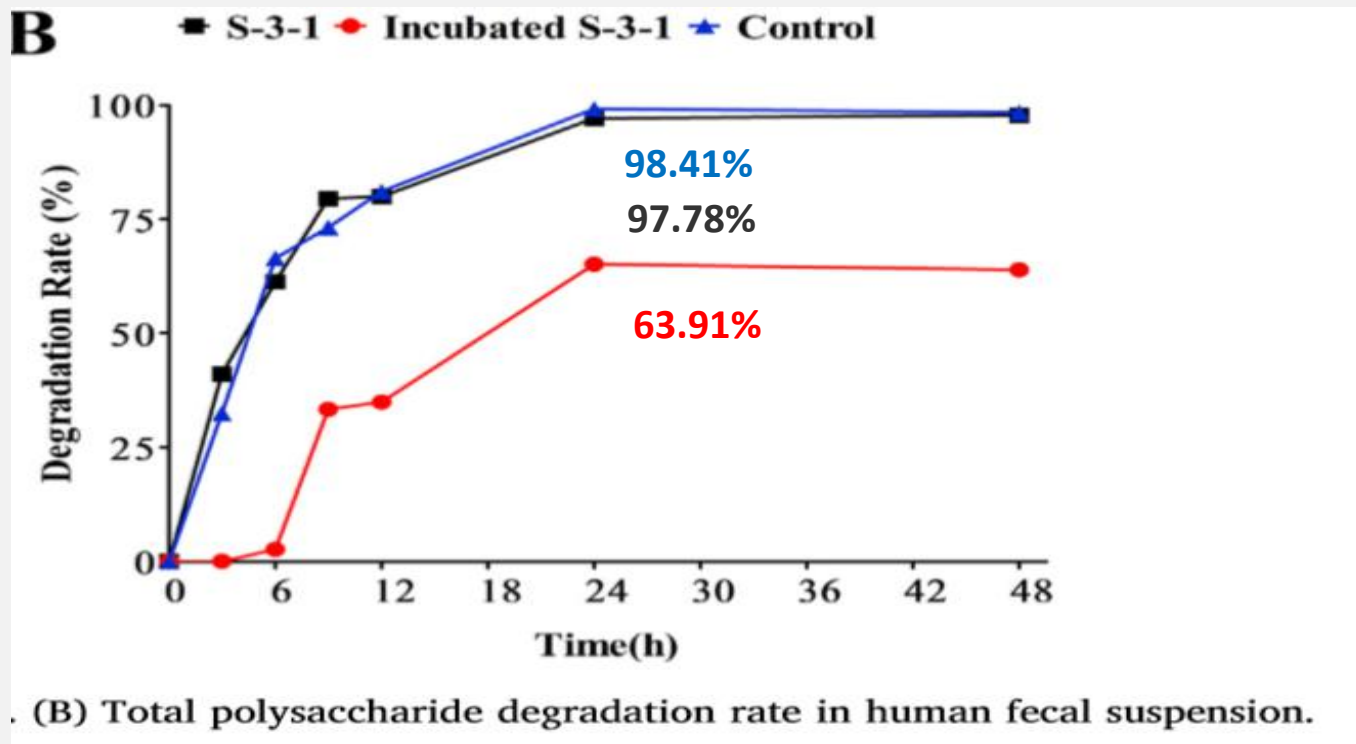
- ✓ 研究目标
- ✓ 成果形式
- ✓ 应用前景

Fig.1A 均匀多糖S-3-1在人工胃肠液中的稳定性



人工肠液中含有胰淀粉酶，它作用于1,4 - Glc的边界区域降解糖链，多糖中含有1,4 - Glc，它将加速还原糖的生产。

Fig.1B S-3-1和孵育后的S-3-1在人粪便悬浮液中的稳定性



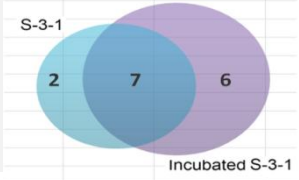
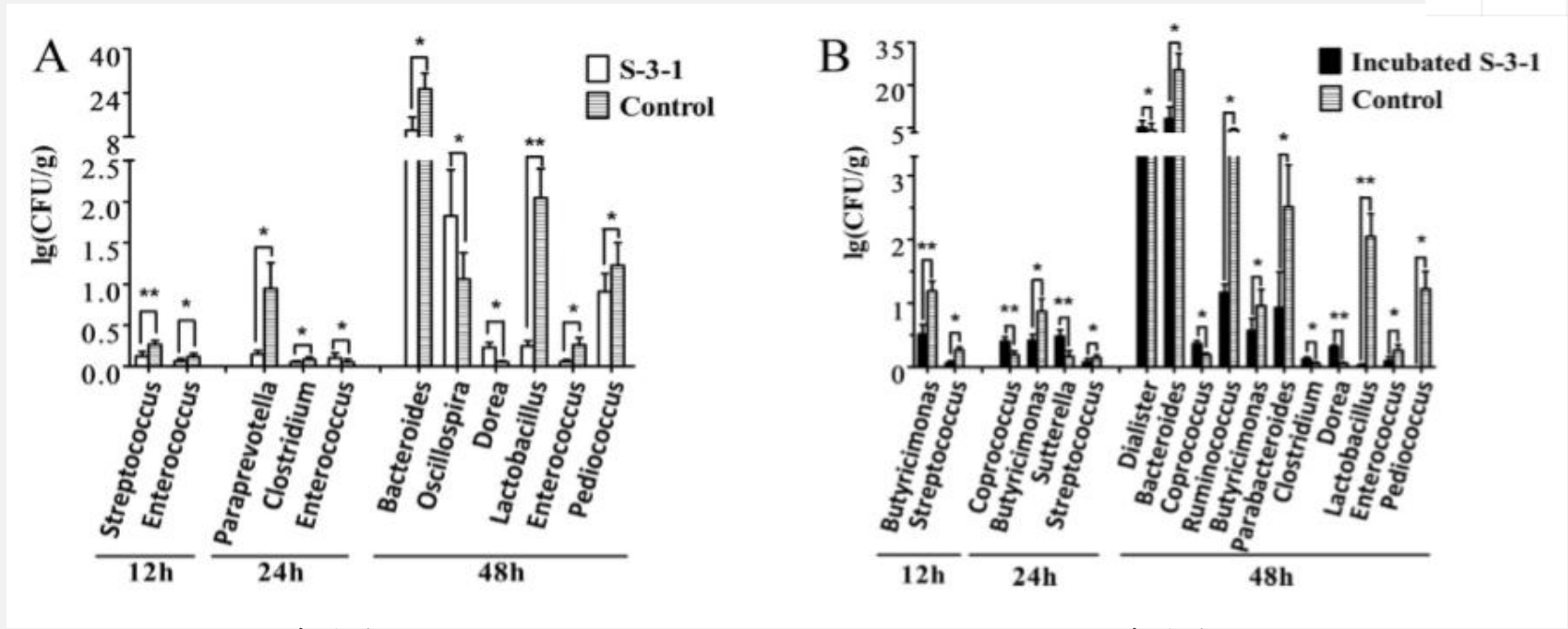


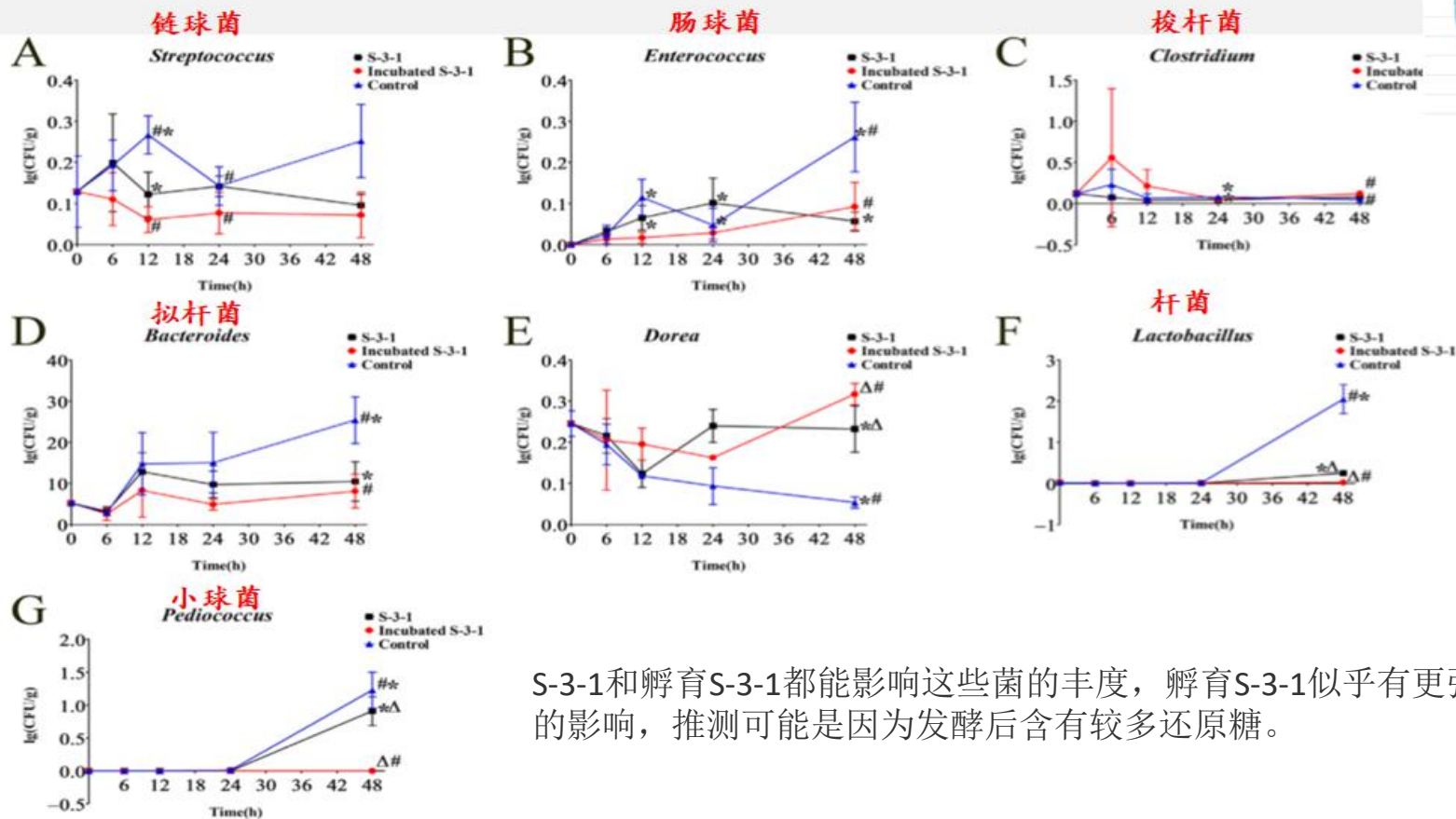
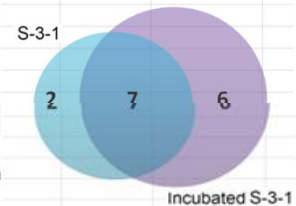
Fig.2 S-3-1与孵育S-3-1对肠道菌群组成的影响



9个属

13个属

Fig.3 在S-3-1组和孵育S-3-1组中，相对丰度都有显著变化的7个属



S-3-1和孵育S-3-1都能影响这些菌的丰度，孵育S-3-1似乎有更强的影响，推测可能是因为发酵后含有较多还原糖。

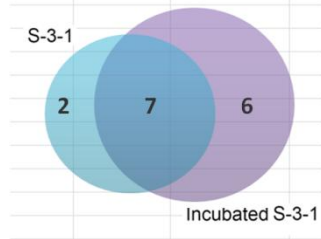


Fig.4 丰度仅在S-3-1下有显著变化的:

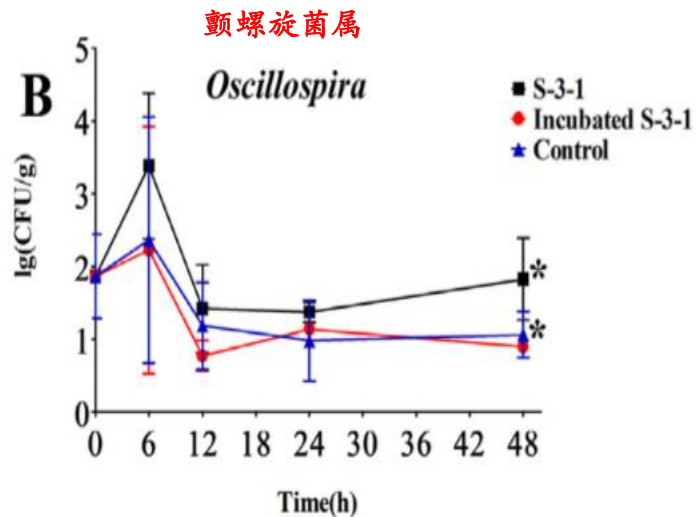
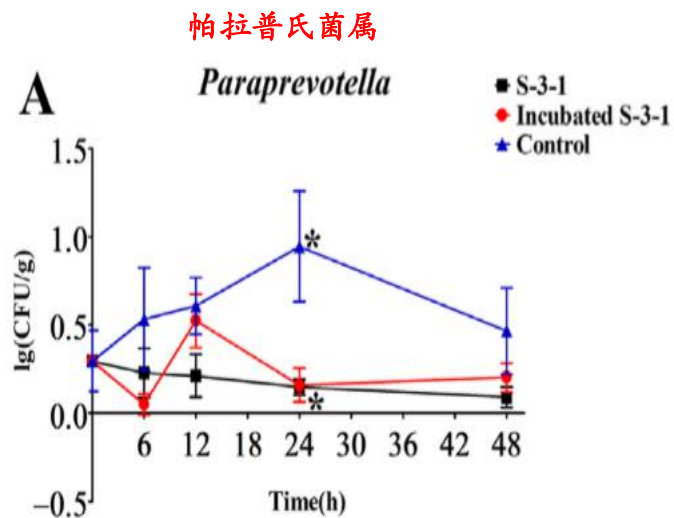


Fig.4 丰度仅在孵育S-3-1下有显著变化的:

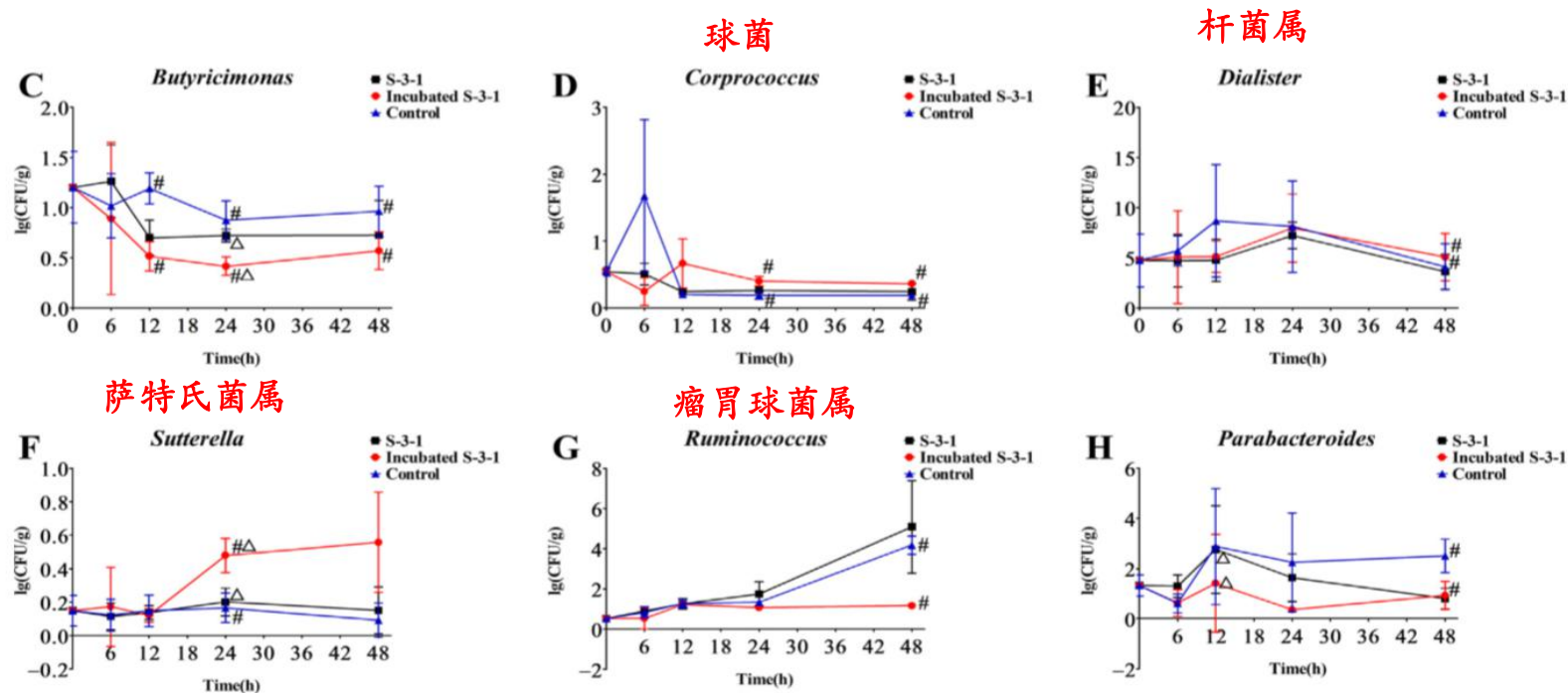


Fig. 4. Abundances of human intestinal microbes (A) *Paraprevotella*. (B) *Oscillospira* with a significant difference between S-3-1 and control groups; (C) *Butyricimonas*. (D) *Coprococcus*. (E) *Dialister*. (F) *Sutterella*. (G) *Ruminococcus*. (H) *Parabacteroides* between incubated S-3-1 and control group. The data were presented as the means \pm S.D. (n = 3). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ compared between the S-3-1 group and control group; # $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$ compared between the incubated S-3-1 group and control group; $\Delta p \leq 0.05$, $\Delta\Delta p \leq 0.01$ compared between the S-3-1 group and incubated S-3-1 group.

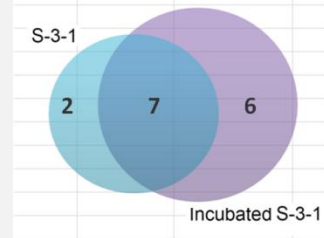


Fig-3、4小结:

- 1) S-3-1和孵育后的S-3-1均可调节人体肠道菌群中链球菌、球菌、拟杆菌、肠球菌、梭菌等的丰度。
- 2) S-3-1只能调节帕拉普氏菌和颤螺旋菌2种菌的丰度，而S-3-1孵育后，受影响菌群转变为瘤胃球菌、萨特氏菌、拟杆菌等6种菌。

Fig.5 粪便悬液中3种SCFA含量变化（检测出7种，3种有显著变化）

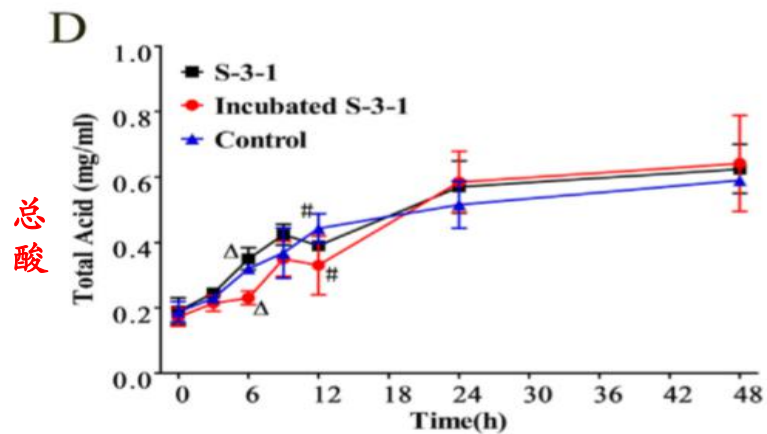
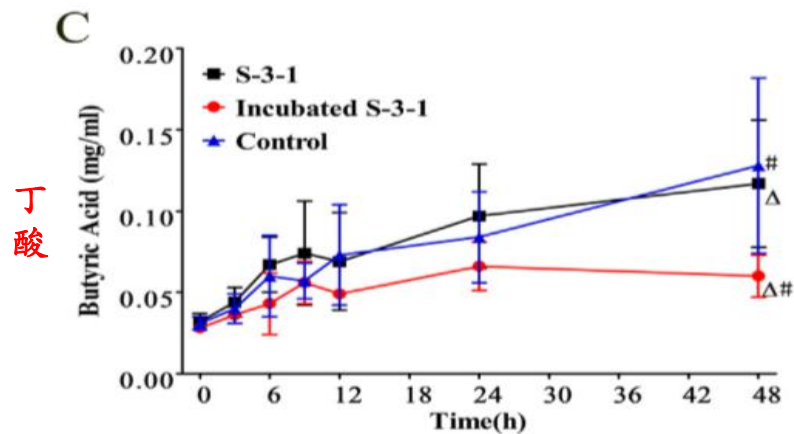
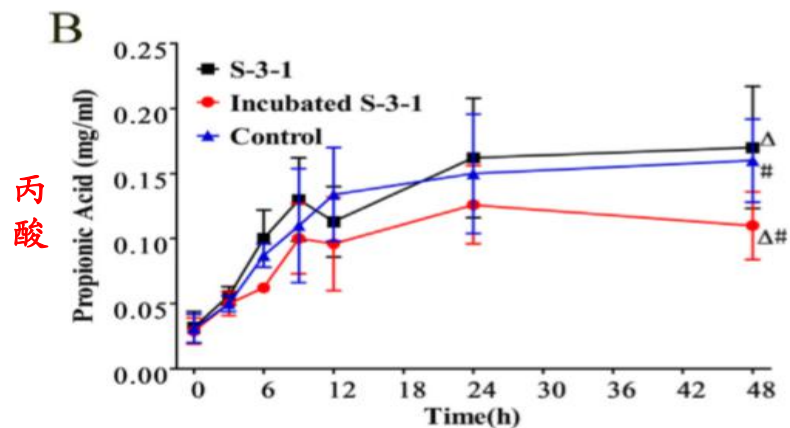
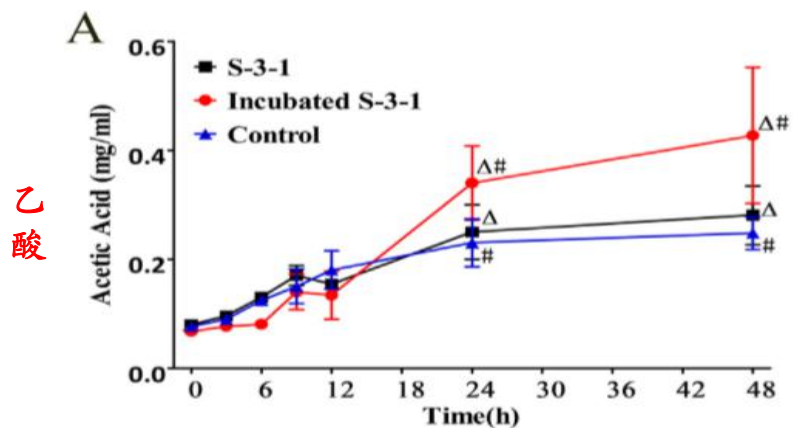


Fig.6 人肠道微生物丰度变化与SCFA含量的相关性研究

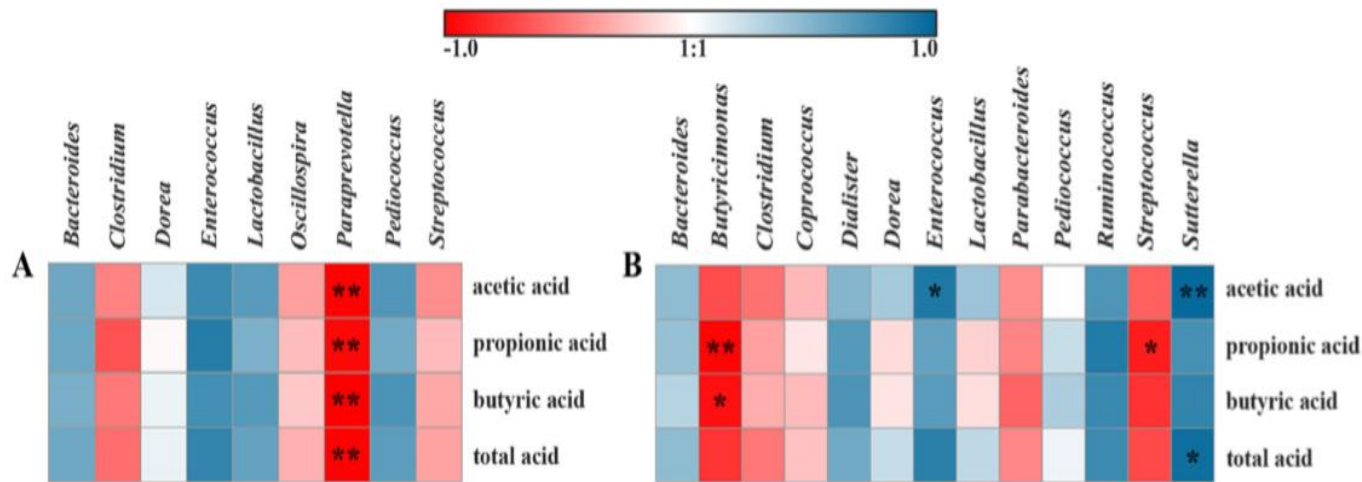
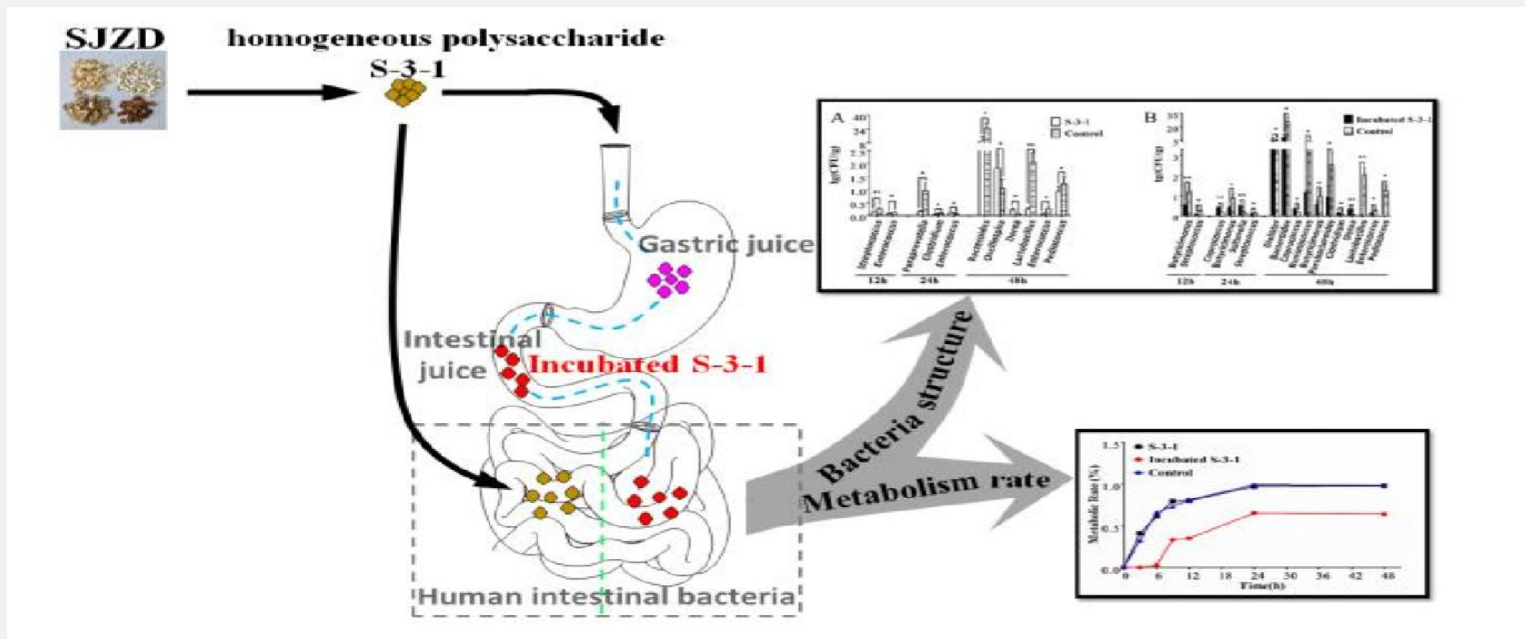


Fig. 6. Correlation between the abundance changes of human intestinal microbes and the SCFA content in (A) S-3-1 (B) incubated S-3-1 group. Heatmap constructed using the R value, obtained by Spearman's correlation analysis. *Represents a p value ≤ 0.05 ; **Represents a p value ≤ 0.01 .

- 1) S-3-1下脂肪酸含量的变化与 Paraprevotella丰度有关。
- 2) 乙酸和总酸含量的增加与孵育S-3-1对Enterococcus、Sutterella及Butyricimonas等丰度的影响有关。

04 结论

- ✓ 问题评估
- ✓ 相关对策
- ✓ 研究总结
- ✓ 成绩与思考



- S-3-1通过调节肠道细菌群的丰度发挥动物调节作用。
- 孵育的S-3-1可以调节更多的细菌，共13种，并可以调节SCFA含量影响免疫调节。
- 胃液和肠液的孵育增强了S-3-1调节肠道菌群组成的能力，降低了细菌对碳源的需求。本研究为多糖体外药理机制的研究提供了新的思路。



敬请各位老师批评指正

T A H N K Y O U F O R W A T C H I N G