

苦荞来源类外泌体囊泡对C57BL/6小鼠生理影响初探

张籍月, 任朝琴, 曹亚楠, 任远航, 彭镰心

A Preliminary Study on the Effects of Tartary Buckwheat-derived Nanoparticles on the Physiology of C57BL/6 Mice

ZHANG Jiyue, REN Chaoqin, CAO Yanan, REN Yuanhang, and PENG Lianxin

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024060055>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

加工方式对苦荞中黄酮类化合物的影响研究进展

Research Progress on the Effects of Processing Methods of Flavonoids in Tartary Buckwheat

食品工业科技. 2021, 42(15): 351-357 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020070008>

苦荞脆片加工工艺优化及其挥发性成分分析

Optimization of Processing Technology and Analysis of Volatile Components of Tartary Buckwheat Chips

食品工业科技. 2021, 42(17): 161-169 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020110185>

过热蒸汽对苦荞粉中黄酮类物质及其抗氧化活性的影响

Effects of Superheated Steam on Flavonoids and Antioxidant Activity in Tartary Buckwheat Flour

食品工业科技. 2025, 46(6): 147-154 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024050096>

苦荞粗多糖涂膜处理对中国樱桃的保鲜效果

Preservation Effect of Tartary Buckwheat Crude Polysaccharide Coating on Chinese Cherry

食品工业科技. 2021, 42(14): 296-301 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020060106>

乳杆菌强化发酵对苦荞酵素抗氧化特性及风味的影响

Effects of *Lactobacillus* Enhanced Fermentation on the Antioxidant Characteristics and Flavor of Tartary Buckwheat Jiaosu

食品工业科技. 2024, 45(2): 118-125 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023020286>

微波协同L-苯丙氨酸处理对苦荞萌发中黄酮的影响

Effects of Microwave-assisted L-phenylalanine Treatment on the Flavonoids of Tartary Buckwheat during Germination

食品工业科技. 2022, 43(5): 191-198 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021060227>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

张籍月, 任朝琴, 曹亚楠, 等. 苦荞来源类外泌体囊泡对 C57BL/6 小鼠生理影响初探 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(11): 329–337. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024060055

ZHANG Jiyue, REN Chaoqin, CAO Yanan, et al. A Preliminary Study on the Effects of Tartary Buckwheat-derived Nanoparticles on the Physiology of C57BL/6 Mice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(11): 329–337. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024060055

· 营养与保健 ·

苦荞来源类外泌体囊泡对 C57BL/6 小鼠 生理影响初探

张籍月^{1,2}, 任朝琴³, 曹亚楠^{1,2}, 任远航^{1,2}, 彭镰心^{1,2,*}

(1. 成都大学农业农村部杂粮加工重点实验室, 四川成都 610106;

2. 四川省杂粮产业化工程技术研究中心, 四川成都 610106;

3. 阿坝师范学院资源与环境学院, 四川阿坝州 623002)

摘要: 目的: 探索饮食中添加苦荞来源的类外泌体囊泡 (TBDNs) 对小鼠主要生理指标的影响。方法: 24 只 C57BL/6 小鼠随机分为两组: 正常对照组与添加 TBDNs 组, 分析体重、血液生化指标、小鼠结肠、肝脏细胞组织学与免疫组织化学, 肠道菌群变化。结果: 相对正常饮食组, 10 mg TBDNs 剂量组小鼠体重、甘油三酯、尿酸、丙氨酸氨基转移酶显著下降 ($P < 0.01$); 天冬氨酸氨基转移酶、胆固醇、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白以及肌酐等生理指标及肝脏、结肠组织等未见显著改变 ($P > 0.05$); 肠道中乳杆菌属 *Lactobacillus*、苏黎世杆菌属 *Turicibacter* 和 *Lachnoclostridium* 均显著提高 ($P < 0.05$)。结论: TBDNs 摄入对小鼠生理有一定影响, 但其作用机制及对健康的意义仍需进一步探讨。研究结果为苦荞的营养评价提供了新的视角与资料。

关键词: 苦荞, 苦荞来源类外泌体囊泡, 肠道菌群, 营养健康

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2025)11-0329-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024060055

本文网刊:



A Preliminary Study on the Effects of Tartary Buckwheat-derived Nanoparticles on the Physiology of C57BL/6 Mice

ZHANG Jiyue^{1,2}, REN Chaoqin³, CAO Yanan^{1,2}, REN Yuanhang^{1,2}, PENG Lianxin^{1,2,*}

(1. Key Laboratory of Coarse Cereal Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chengdu University, Chengdu 610106, China;

2. Sichuan Province Engineering Technology Research Center of Coarse Cereal Industrialization, Chengdu 610106, China;

3. School of Resources and Environment, Aba Normal University, Aba Prefecture 623002, China)

Abstract: Objective: To investigate the effects of dietary supplementation with tartary buckwheat-derived nanoparticles (TBDNs) on key physiological parameters in mice. Methods: Twenty-four C57BL/6 mice were randomly assigned to two groups: a normal control group and a TBDNs group. Changes in body weight, blood biochemical markers, cell histology and immunohistochemistry of the colon and liver, as well as intestinal flora composition, were analyzed. Results: Compared to the normal diet group, the 10 mg TBDNs group exhibited significant reductions in body weight, triglyceride levels, uric acid levels, and alanine aminotransferase activity ($P < 0.01$). Physiological indicators such as aspartate aminotransferase, cholesterol, high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and creatinine, as well as liver and colon tissues, showed no significant changes ($P > 0.05$). The abundance of intestinal *Lactobacillus*, *Turicibacter*, and *Lachnoclostridium* species were all significant increased ($P < 0.05$). Conclusion: Intake of TBDNs has discernible physiological effects on mice, however,

收稿日期: 2024-06-06

基金项目: 四川省科技厅计划项目 (2023ZYD0078); 现代农业产业技术体系四川杂粮创新团队专项资金 (SCCXTD-2024-20); 阿坝师范学院重点培育项目 (AS-PYZD2023-02)。

作者简介: 张籍月 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 杂粮精深加工与功效评价, E-mail: 1053475756@qq.com。

* 通信作者: 彭镰心 (1981-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 杂粮精深加工与功效评价, E-mail: penglianxin@cdu.edu.cn。

further investigations are required to elucidate its underlying mechanisms and potential health benefits. These findings provide novel insights and data for nutritional evaluation of tartary buckwheat.

Key words: tartary buckwheat; tartary buckwheat-derived nanoparticles; gut microbiota; nutrition and health

苦荞麦 *F. tataricum* 属蓼科(Polygonaceae)荞麦属(*Fagopyrum*)植物^[1],是传统的食药兼用谷物,富含多种营养功能物质,如抗性淀粉、多酚、活性肽、多糖等^[2]。已有研究表明,苦荞具有降糖、降脂、降压和改善微循环等作用,常推荐用于降低三高的饮食健康管理谷物^[3]。然而,仅从传统营养活性成分角度解析苦荞营养作用机制尚存争议,例如,Stewart 等^[4]报道 1.2% 槲皮素喂养 8 周不能改善高脂饮食诱导的胰岛素抵抗,与传统认为黄酮类成分是苦荞发挥降脂活性的营养物质认识不一致。因此苦荞中可能尚存其它“营养暗物质”发挥生理作用。

植物细胞向外分泌的类外泌体样纳米颗粒(exosome-like nanoparticles, ELNs),是具有纳米样结构的囊泡,含脂类、蛋白、miRNA 等。目前,已有大量研究证明 ELNs 具有多种生理功能,如葡萄^[5-7]、生姜^[8-9]、橙子^[10]、蓝莓^[11]等的外泌体样纳米颗粒。研究发现,来自葡萄、胡萝卜和生姜的外泌体样纳米颗粒可介导小鼠肠道组织重塑和预防炎症性肠病,减轻肠道屏障损伤引起的免疫反应^[7]。蓝莓来源的外泌体样纳米颗粒(blueberry exosomes-like nanoparticles, BELNs),能改善高脂饮食(high-fat diet, HFD)喂养的小鼠非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)模型的胰岛素抵抗,并具有调节脂肪酸合成基因的表达以及 Nrf2 在肝脏的分布减轻肝脏的氧化应激反应等作用^[11]。越来越多证据表明植物来源的类外泌体样纳米颗粒(PELNs)参与人体生理活动并发挥相关功能^[12]。因此从 PELNs 层面揭示苦荞生物效应可为苦荞的质量评价提供新的观点。

课题组前期从苦荞中提取类外泌体,体外实验发现其能被肠道菌群吸收;生信分析与体外验证结果表明苦荞来源类外泌体囊泡(Tartary buckwheat-derived nanoparticles, TBDNs)可以调节鼠李糖乳杆菌、大肠杆菌的生长,这可能与 TBDNs 中含有的脂质、蛋白以及 miRNA 等非编码 RNA 有关^[13],从 TBDNs 角度阐明苦荞饮食合理性具有重要意义。《本草纲目》记载苦荞“发风动气、能发诸病”,说明长期食用苦荞可能对健康产生不利影响。因此本文重点考察在正常饮食条件下 TBDNs 对 C57BL/6 小鼠生理指标的影响,为进一步揭示 TBDNs 对健康的影响提供资料,也为后续苦荞营养功能评价奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

川荞 1 号种子 农业农村部杂粮加工重点实验室;饲料 北京华阜康生物科技股份有限公司;7~8 周龄 C57BL/6 小鼠 成都药康生物科技有限公

司,许可证号:SCXK(川)2020-034;丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)测定试剂盒、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)测定试剂盒、肌酐(creatinine, CREA)测定试剂盒、尿酸(uric acid, UA)测定试剂盒、总胆固醇(total cholesterol, TC)测定试剂盒、总甘油三酯(total triglycerides, TG)测定试剂盒、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)测定试剂盒、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)测定试剂盒 Mindray;HE 染液套装 Leagene;Tunel 试剂盒、枸橼酸抗原修复液(pH6.0)、TLR4、Myd88、CY3 标记的山羊抗兔 IgG 赛维尔生物科技有限公司;山羊血清 Biosharp;一抗 TLR2、NF-KB P65 华安生物;抗荧光淬灭封片剂 Southern-Biotech。

D3024 台式高速微量离心机、D3024R 台式高速冷冻离心机、SLK-O3000-S 数控摇床 美国赛洛捷克 SCILOGEX;THZ-82A 数显气浴恒温振荡器 常熟朗越仪器制造有限公司;KZ-III-F 高速低温组织研磨仪 武汉赛维尔生物科技有限公司;BS360S 全自动生化分析仪 迈瑞 Mindray;STP420 ES 快速组织脱水机、Varistain™ Gemini ES 全自动染色机 赛默飞世尔 Thermo scientific;S1010E 脱色摇床 SCIL-OGEX;BC004 组化笔 Biosharp、CX40 荧光显微镜 SOPTOP、Pannoramic SCAN II 病理切片扫描仪 3DHISTECH Kft。

1.2 实验方法

1.2.1 苦荞预处理 选用未受虫害影响且充实饱满的川荞 1 号种子,经过清洗、去除灰尘和杂质后,使用 50 ℃ 的烘箱烘干 8 h,随后粉碎研磨并通过 50 目筛子过滤,以备后用。

1.2.2 TBDNs 的提取流程 根据生姜外泌体提取方法进行优化^[14],称取川荞 1 号种子粉末,加适量水混合后孵育过夜。次日,将苦荞水溶液,在 4 ℃ 条件下,依次以 1000×g, 10 min、3000×g, 20 min、10000×g, 30 min 进行离心操作,取上清液用 1 μm 过滤器进行过滤处理,加入 PEG-6000 使终浓度为 10% 并孵育过夜。次日,在 4 ℃ 条件下,以 10000×g, 30 min 进行离心,去除上清液后留下沉淀,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)溶液重悬,最后放-80 ℃ 保存。通过扫描电镜、粒度分析等对外泌体进行表征。

1.2.3 动物分组 小鼠饲养于温度 20~25 ℃、相对湿度 45%~55% 的动物房内,自由摄食和饮水,昼夜节律正常。所有动物实验规程均由成都大学实验动物伦理与福利委员会审核批准,动物实验涉及的所有程序均按照中国动物福利委员会的原则和指导方针

执行。将 24 只小鼠随机分为 2 组,每组 12 只,分别为:正常饮食组(C)和正常饮食+10 mg TBDNs 灌胃组(C₁₀),喂养 8 周后进行解剖实验。基础饲料为北京华阜康生物科技股份有限公司提供的维持饲料(编号:1025);TBDNs 用 PBS 分散后进行灌胃,空白组灌胃 PBS 作为对照。

1.2.3.1 体重、进食量监测 每次灌胃前对每组小鼠的体重以及进食量进行监测称量(该监测以分组后第一天的体重、进食量作为起始点)。

1.2.3.2 小鼠血液生化指标检测 将小鼠禁食不禁水 16 h,腹主动脉采血测定丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C)、肌酐(CREA)和尿酸(UA)八大血液生化指标。具体实验步骤按试剂盒说明书进行操作。

1.2.3.3 组织 H&E 及油红 O 染色分析 分别取小鼠结肠组织、肝脏组织进行 H&E 染色和油红 O 染色^[15],进行组织病理学检查。分析小鼠肠上皮细胞炎症浸润以及肝脏中脂滴的累积情况。

1.2.3.4 小鼠结肠、肝脏组织免疫荧光 对小鼠的结肠、肝脏组织切片进行免疫荧光实验,以观察其结肠的屏障通透性和肝脏免疫细胞的表达、分布。首先进行石蜡切片前处理:a.石蜡切片脱蜡至水;依次将切片放入二甲苯 I 15 min,二甲苯 II 15 min,无水乙醇 I 5 min,无水乙醇 II 5 min,85%酒精 5 min,75%酒精 5 min,蒸馏水洗。b.抗原修复:向微波炉专用容器中加入合适的修复缓冲液(柠檬酸缓冲液)高火加热至沸腾,取出放入拨片,中火 8 min 至沸,停火 8 min,转中低火 7 min。自然冷却后将玻片置于 PBS(pH7.4)中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5 min。c.阻断内源性过氧化物酶:切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈(防止抗体流走),切片放入 3% 过氧化氢溶液,室温避光孵育 15 min,将玻片置于 PBS(pH7.4)中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5 min。然后参考赵婉均^[11]的实验方法,稍作修改:d.血清封闭:在圈内滴加 5% 山羊血清孵育 30 min。e.加一抗:轻轻甩掉封闭液,在切片上滴加 PBS 按 1:200 比例配好的 F480、CD4、MPO,切片平放于湿盒内 4 ℃ 孵育过夜;f.加二抗:玻片置于 PBS(pH7.4)中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5 min。切片稍甩干后在圈内滴加 CY3 标记山羊抗兔 IgG 二抗覆盖组织,避光 37 ℃ 孵育 50 min。然后进行 DAPI 复染细胞核、封片,最后在显微镜下观察拍照。

1.2.3.5 16S rRNA 测序 参考 Peng 等^[16]方法分析 TBDNs 灌胃组与正常组小鼠肠道的粪便微生物组成。对小鼠粪便微生物进行 16S rRNA 测序,设置的 16S 引物为:Primer5'-3': 8F(5'-AGAGTTTGATC ATGGCTCAG-3')和 1492R(5'-CGGTTACCTTGTT ACGACTT-3'),对提取的 RNA 进行 PCR 后再建库,建库后采用 Nanopore GridION 测序仪测序,测

序试剂盒使用 MinION Flow Cell(R9.4);此外,还进行了 OTU 聚类 and 注释分析。利用 α 多样性和 β 多样性作为基础,对粪便微生物的菌落组成进行了分析,并比较了 TBDNs 灌胃处理组对肠道微生物属水平的影响。

1.3 数据处理

小鼠的生理生化指标、肝脏与结肠病理检测和小鼠肠道菌群的物种丰度比较各项实验,通过 GraphPad Prism 9.5.0 软件对所有实验数据进行深入的统计学分析,使用平均值 $\pm$ 标准差作为表示。两组之间的差异通过 ANOVA 方差统计进行对比。所有的研究结果都在三次或更多次独立的重复实验后得到。在小鼠肠道菌群的研究中,使用 R 语言对数据进行转化,并对 Alpha 多样性和 Beta 多样性进行分析;采用 Origin 8.0 制作箱式图。

2 结果与分析

2.1 TBDNs 对 HFD 小鼠体重、进食量的影响

在本研究中,通过差速离心与 PEG 沉淀法结合从苦荞中分离出 TBDNs 样品,在透射电子显微镜下,能够观察到典型的茶托型囊泡结构,如图 1A 所示。提取的 TBDNs 经过粒径测试结果见图 1B,其平均粒径为 182.8 nm,粒径主峰在 162.8 nm。本研究提取出的 TBDNs 与前期课题组采用超速离心法提取的 TBDNs 的表征相似^[13]。因此,可以说明本文成功从苦荞中优化提取出了 TBDNs。

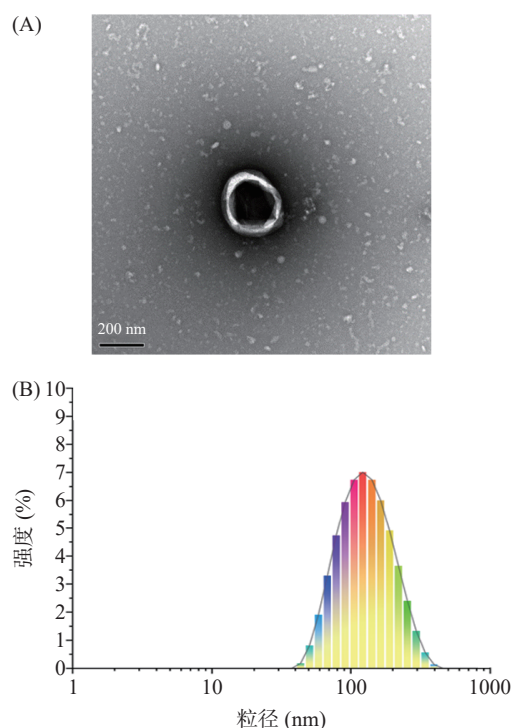


图 1 苦荞来源的纳米颗粒表征

Fig.1 Characterization of TBDNs

注:(A)苦荞来源的纳米颗粒电镜图(100000 $\times$);(B)苦荞来源的纳米颗粒粒径分布。

相关研究报道,PELNs 能够被动物的胃肠道吸收从而会影响其生理状态。因此,首先考察了苦荞类外

泌体囊泡(TBDNs)对小鼠生理的影响。PEG 提取得到的 TBDNs 沉淀分离后称重,每 100 g 苦荞约可提取 10 mg 的 TBDNs。根据《中国居民膳食指南

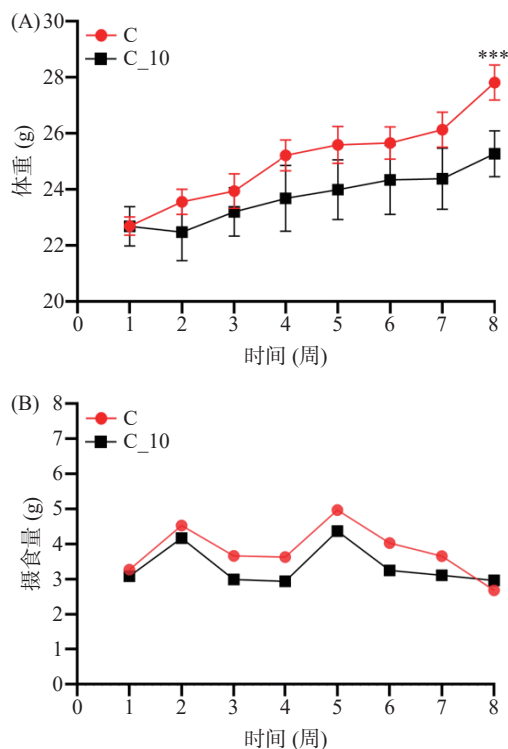


图2 TBDNs 喂养对小鼠体重以及日均摄食量的影响

Fig.2 Effects of feeding TBDNs on the body weight and daily food intake of mice

注:(A)不同处理组小鼠体重增长曲线;(B)不同处理组小鼠日均摄食量差异; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; **** $P<0.0001$; ns $P>0.05$; 图3、图4、图7、图9同。

(2022)》推荐,每天摄入全谷物及杂豆类 50~150 g (干重)^[17]。因此,选用 10 mg TBDNs 进行灌胃。在本研究中,对 C57BL/6 小鼠进行 10 mg TBDNs 灌胃 8 周后,TBDNs 灌胃组(C_10)体重增长曲线低于正常饮食组(C)体重增长曲线(图 2A); TBDNs 灌胃组(C_10)小鼠体重为 25 g 左右,与正常饮食喂养组小鼠相比,体重显著降低($P<0.001$)。进一步统计所有小鼠的摄食量发现(图 2B), TBDNs 灌胃组(C_10)的日均摄食量略低于正常组(C)小鼠。这些结果表明,TBDNs 可能会通过影响食欲来影响正常饮食小鼠的体重。但 TBDNs 影响小鼠体重的原因和途径需进一步分析。

2.2 TBDNs 对小鼠血液生化指标的影响

近年来,植物来源的类外泌体在改善各种疾病方面的潜力引起了广泛关注。本研究探讨了 TBDNs 对小鼠血液生化指标的影响,并将结果与其他植物来源类外泌体的研究进行了比较。在本实验中,C57BL/6 小鼠经过 8 周的 TBDNs 灌胃处理后,对其血液生化指标进行了测定。结果显示,与正常对照组相比,TBDNs 处理组的丙氨酸氨基转移酶(ALT)、甘油三酯(TG)和尿酸(UA)水平显著降低($P<0.01$) (图 3A、C、H)。这一发现与其他植物来源类外泌体的研究结果相似。例如,Berger 等^[10]发现橙汁衍生的纳米囊泡(ONVs)能够降低甘油三酯的含量,同时还能降低胃肠道疾病中的炎症水平和血脂水平。赵婉均^[11]的研究也表明,蓝莓类外泌体(BELNs)可以显著降低肥胖小鼠血清中的 TG、TC、LDL-C、AST 和 ALT 的水平。

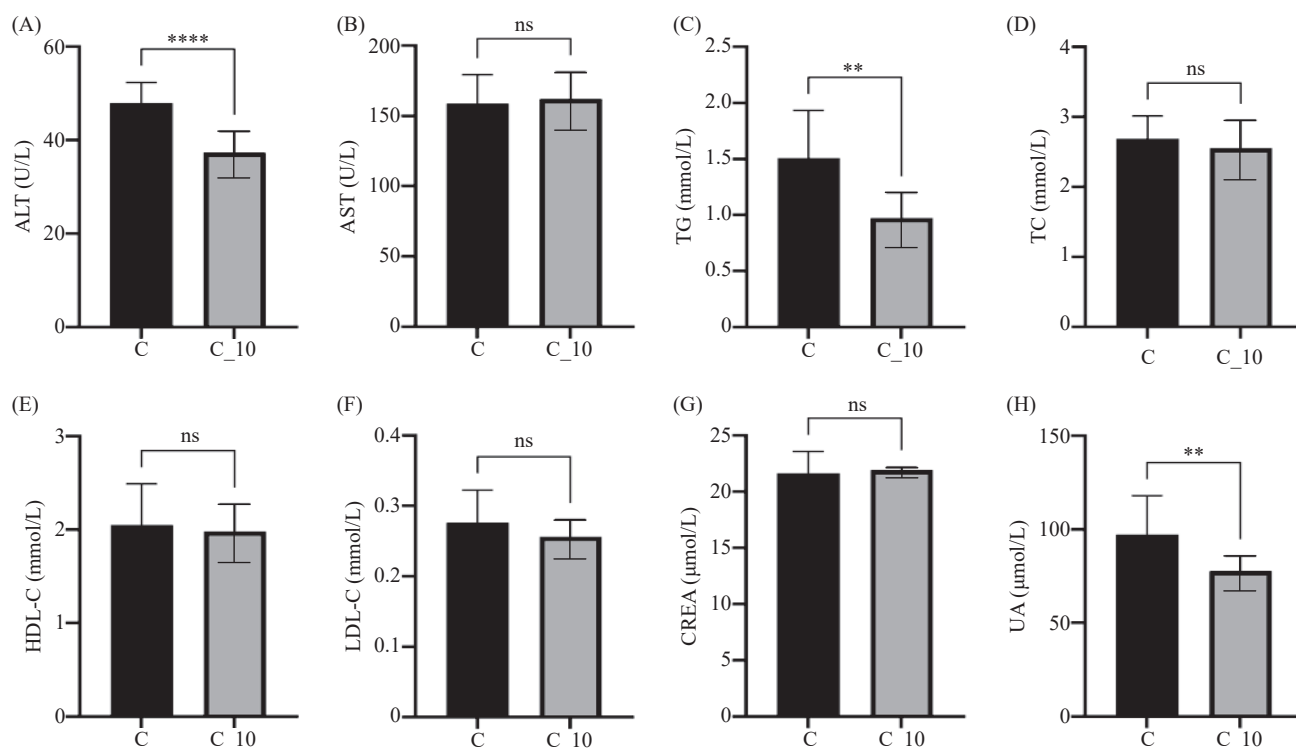


图3 TBDNs 对小鼠肝功能、肾功能的影响

Fig.3 Effects of TBDNs on liver function and kidney function in mice

虽然 TBDNs 降低了 ALT、TG 和 UA 的水平,但这些指标并未低于正常值。这种适度的调节作用可能暗示了 TBDNs 在维持生理平衡方面的潜在益处。然而,这些生理指标变化的健康意义还需要进一步分析。与 BELNs 不同,本文的研究发现 TBDNs 对天冬氨酸氨基转移酶(AST)、胆固醇(TC)、高密度脂蛋白(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C)以及肌酐(CREA)水平均没有显著影响($P>0.05$)(图 3B、D、E、F、G)。这种差异可能源于类外泌体的来源、提取方法以及实验动物模型的不同。基于本研究结果,认为在正常情况下摄入 TBDNs 对血液生化指标的影响相对较小。为了更全面地了解 TBDNs 的生理效应,未来的研究可以考虑增加 TBDNs 的浓度,或者在不同的生理和病理模型中进行观察。这不仅有助于深入了解 TBDNs 的作用机制,还可能为开发基于植物类外泌体的新型功能性食品或治疗策略提供重要依据。

2.3 TBDNs 对小鼠肝脏、结肠的影响

膳食对肠道微生物群、屏障功能和黏膜免疫具有重要影响,膳食摄入在炎症性肠病(IBD)发生发展中起着关键作用^[18];同时肝脏是负责脂质代谢的主要器官,血脂异常与肝脏脂质积累高度相关^[19]。研究报道,通过一个月的 ONVs 治疗逆转了饮食诱导的肠道改变,并调节参与免疫反应(肿瘤坏死因子 [TNF]- α 和白细胞介素 [IL]-1 β)、屏障通透性(CLDN1、OCLN、ZO1)和脂肪吸收和乳糜微粒释放的基因的 mRNA 水平,作为膳食补充剂保护了肠道和肝脏免受与高蔗糖饮食相关的脂肪过载的影响^[10]。此外,来自生姜^[8]、胡萝卜^[7]和葡萄^[5]的外泌体样纳米囊泡能够减轻肠道屏障损伤引起的免疫反应,对小鼠肠道组织重塑从而达到预防炎症性肠病的作用,蓝莓来源的外泌体样纳米囊泡还能改善肝功能障碍^[7,11]。因此,植物来源的类外泌体可能通过多种途径影响肠道和肝脏生理。

《本草纲目》记载苦荞“发风动气、能发诸病”,其机理尚无合理解析。由于对 TBDNs 的功能认识尚不足,本文首先考虑在正常条件下摄入 TBDNs 对小鼠传统生理指标、肝脏以及结肠组织等的影响。HE 染色结果表明,两组肠道上皮细胞的炎性细胞浸润以及肝组织切片均无显著变化(图 4A、B)。油红 O 染色(图 4C)和脂滴面积定量分析(图 4D)同样显示无显著性变化($P>0.05$)。进一步通过评估正常组和 TBDNs 组对小鼠结肠屏障功能的影响(图 5),发现与正常组相比,TBDNs 组的肠上皮 Occludin 和 ZO-1 的表达也未发生显著改变。对肝组织免疫组化检测,评估正常组和 TBDNs 组对小鼠抗原抗体的反应(图 6)。与正常组相比,TBDNs 组的 CD4、F480、MPO 的表达未发生显著变化。这些结果表明正常饮食下添加 TBDNs 对肝脏炎症、脂肪积累、肠道屏障功能等无不良影响。

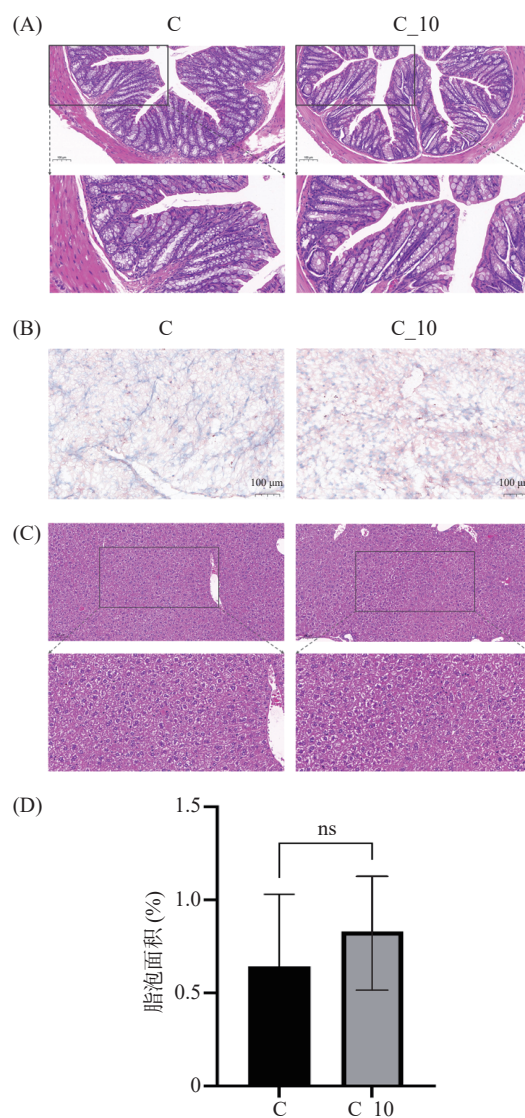


图 4 TBDNs 对小鼠肝脏、结肠的影响

Fig.4 Effects of TBDNs on liver and colon in mice

注: (A)结肠 HE 染色(200 $\times$); (B)肝脏 HE 染色(200 $\times$); (C)肝脏油红 O 染色(200 $\times$); (D)肝脂面积。

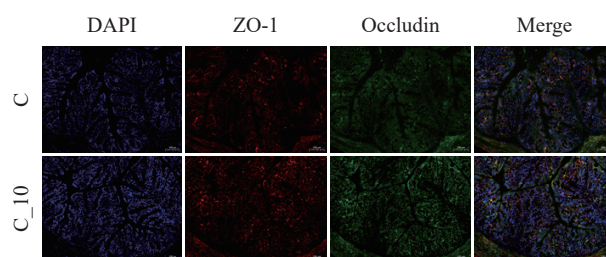


图 5 TBDNs 对小鼠结肠组织中屏障相关蛋白的影响(200 $\times$)

Fig.5 Effect of TBDNs on barrier-associated proteins in mouse colon tissue (200 $\times$)

2.4 肠道菌群分析

2.4.1 肠道微生物多样性分析 本研究扩增 16S rRNA 获得粪便微生态中的细菌群落结构。本实验中所测得的样本共获得 428661 条序列。通过比对过滤后,共得到 325437 条有效的序列用于后续的分析。对粪便微生态 α 多样性的分析,可以看出,正常

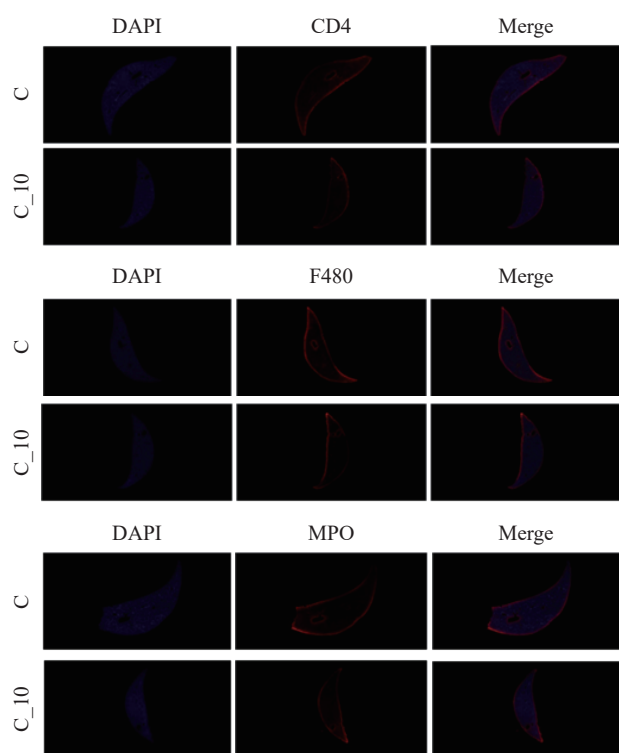


图6 小鼠肝脏组织中 CD4⁺、MPO⁺和 F4/80⁺细胞的免疫组织化学染色(9×)

Fig.6 Representative liver sections stained with antibodies to CD4⁺, myeloperoxidase⁺ (MPO⁺) and F4/80⁺ (9×)

组与 TBDNs 组对应的 Chao1 指数、Shannon 指数、Simpson 指数以及 PD 指数均无显著性差异 ($P > 0.05$) (图 7), 表明 TBDNs 的摄入不会对正常小鼠肠道微生物生态造成紊乱, 仍能维持良好的肠道稳态。

2.4.2 物种组成分析 同时, 从图 8 也可以看出, TBDNs 组与正常组样本间共有的 OUT 数目占比高达 99.65% (图 8A), TBDNs 处理组样本间特有的 OUT 数目共有 93 种。对不同处理间的 β 多样性分析结果如图 8C, 本实验基于主坐标 PCoA 分析表明, 正常组的肠道微生物群落与 TBDNs 处理组虽然没有达到显著差异, 但也可以看出其分布的不同, 这可能受动物个体差异的影响较大。在属水平上可以看出, 正常组与 TBDNs 组的肠道微生物群落组成比例有一定差异 (图 8B)。正常组的优势菌群有乳杆菌属 *Lactobacillus*、瘤胃球菌属 *Ruminococcus*、拟杆菌 *Bacteroides*、苏黎世杆菌属 *Turicibacter* 和蓝绿藻菌属 *Lachnospirillum*。

相比正常组, TBDNs 组的乳杆菌属 *Lactobacillus*、苏黎世杆菌属 *Turicibacter* 和蓝绿藻菌属 *Lachnospirillum* 的相对丰度显著增加 ($P < 0.05$) (图 9)。研究表明, *Lactobacillus* 是一种益生菌, 对人体健康有着重要的作用, 具有抑制有害菌的生长, 维护肠道菌群平衡, 防止肠道感染和炎症的作用^[20-21]。*Lachnospirillum* 与多种代谢性疾病的发生密切相关, 包括肥胖、高血压、糖尿病等, 其相对丰度与血糖水平呈负相关^[22-25]。*Lachnospirillum* 是一种能够利用单糖和双糖产生乙酸的细菌, 而乙酸可以通过抗

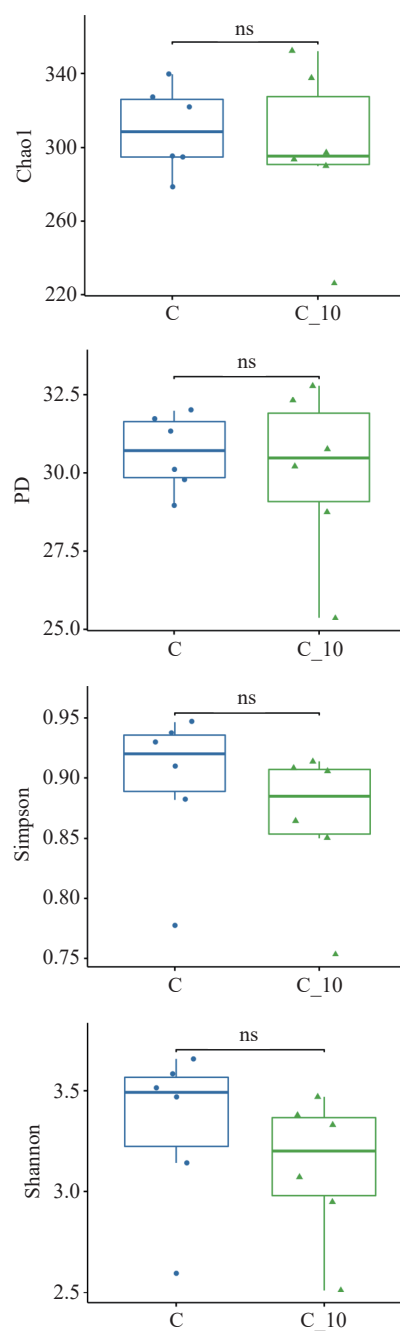


图7 α 多样性指数

Fig.7 Alpha diversity index

炎和免疫抑制作用有效地稳定肠道内环境^[22]。此外, 乙酸还可以作为细菌的 ATP 产生的氧化产物, *Lachnospirillum* 的丰度与肠道内乙酸水平呈正相关, 而且 *Lachnospirillum* 还能够通过代谢 L-谷氨酸来产生乙酸等短链脂肪酸, 这些短链脂肪酸对于肾脏保护具有重要作用, 如抗炎、抗动脉粥样硬化和抗氧化等^[24]。因此, 这些有益菌的增加具有潜在的健康效益。

本文的研究结果显示, TBDNs 组中的瘤胃球菌属 *Ruminococcus* 的相对丰度显著降低 ($P < 0.05$)。研究发现, 活跃期炎症性肠病 (IBD) 通常伴随着瘤胃球菌 (*Ruminococcus gnavus*) 的增加^[26]。由于炎症促进黏膜氧化应激, 这可能会形成土著微生物群落, 有利于兼性厌氧菌的生长, 如 *Ruminococcus gnavus*^[26],

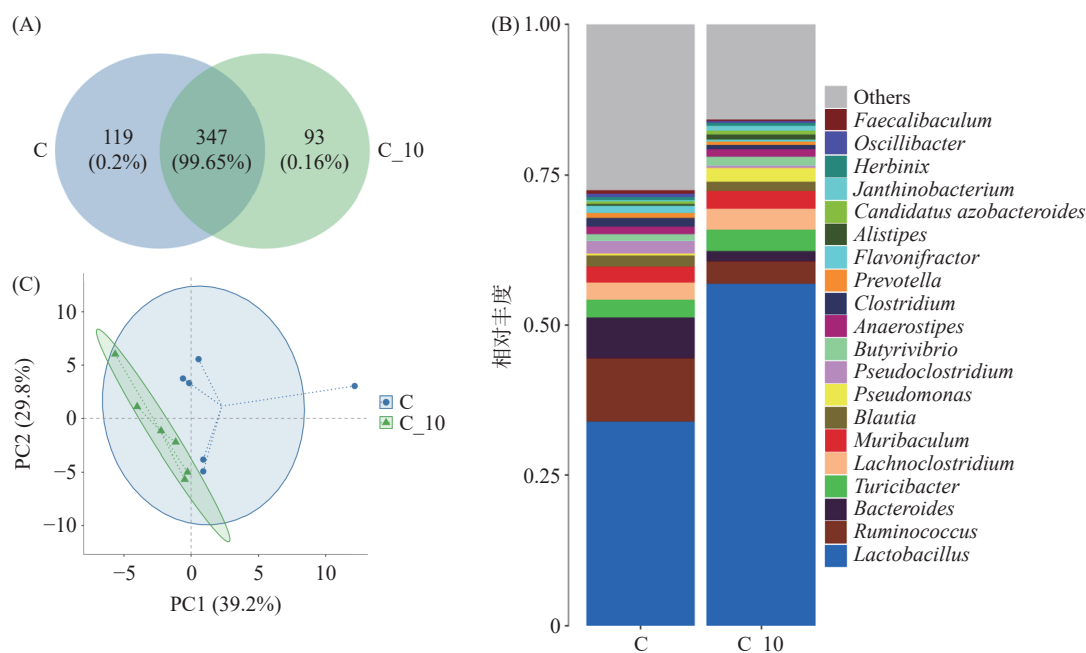


图 8 TBDNs 对小鼠肠道菌群的影响

Fig.8 Effect of TBDNs on intestinal microbiota in mice

注: (A)Venn 图; (B)属水平上的物种组成; (C)PcoA 图。

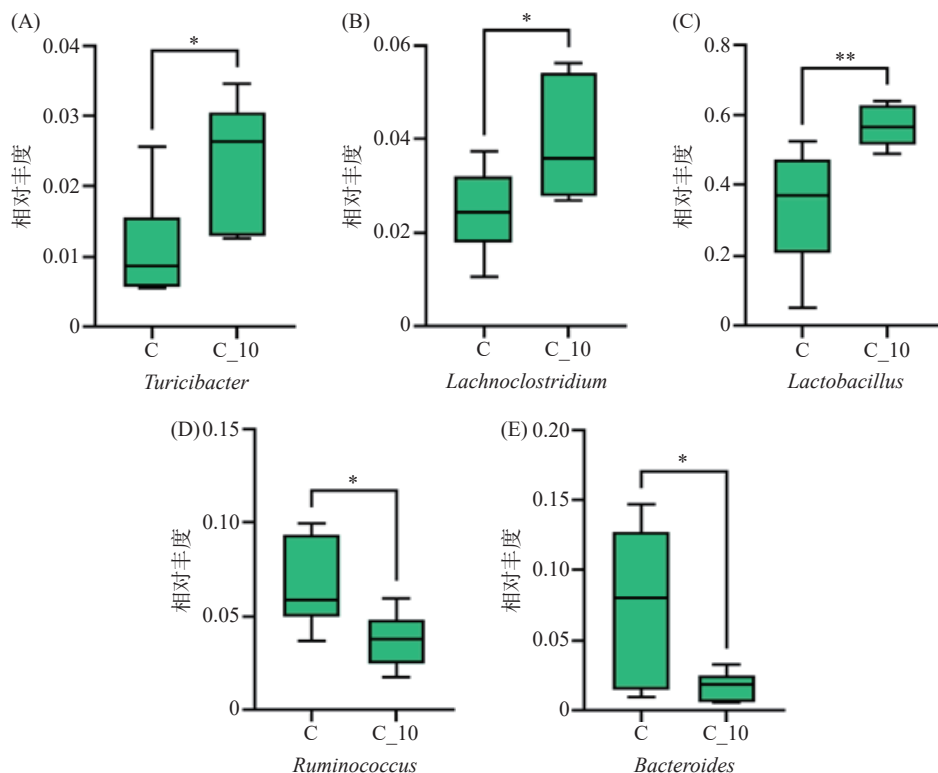


图 9 TBDNs 对小鼠肠道菌群影响的物种丰度比较

Fig.9 Comparison of species abundance of TBDNs on the gut microbiota of mice

它被认为是 IBD 中改变的微生物群的重要菌群。此外, *R. gnavus* 还与其他免疫相关疾病如儿童哮喘、婴儿湿疹、脊柱关节炎、系统性红斑狼疮、超重肥胖和一些代谢疾病(II 型糖尿病、非酒精性脂肪肝等)有关,大部分研究认为,瘤胃球菌属与 II 型糖尿病呈正相关,但也有小部分研究结果不一致^[27-35]。研究表明,在减肥手术和糖尿病缓解后, *Ruminococcus bromii*、*Ruminococcus obeum* 丰度增加,而 *Rumino-*

coccus torques 丰度降低^[36-38]。这些现象可能是由于瘤胃球菌偏好植物中的多糖,如果肠道中有过多的瘤胃球菌,细胞会吸收更多的糖,不可避免地导致体重增加^[39]。因此,肠道中瘤胃球菌属的丰度会受到饮食的影响,但饮食的作用似乎很复杂,该复杂作用可能源于瘤胃球菌属的复杂构成。瘤胃球菌属包括有益菌和有害菌。例如,已知 *Ruminococcus bromii* 对健康具有有益效果。当长期食用水果和蔬菜时,瘤胃球

菌属能够发酵复合糖类,产生乙酸酯、丙酸盐以及具有抗炎效益的丁酸盐^[39]。而肉食会增加有害菌 *Ruminococcus gnavus*, 部分瘤胃球菌属已被证明具有促炎性,除了肉食之外,高盐饮食、大豆、抗性淀粉也会增加瘤胃球菌的丰度^[40-43]。

灌胃 TBDNs 也显著降低了拟杆菌属 *Bacteroides* 的丰度($P<0.05$)。不同拟杆菌种类与不同炎症性肠病程度相关,炎症性肠病患者粪便微生物分析显示,拟杆菌门、厚壁菌门和疣微菌门的丰度下降,而变形菌门、放线菌门和梭杆菌门的丰度增加。在 48 名克罗恩病患者中,粪便样本中的拟杆菌细菌丰度不到健康个体的 10%^[44-46]。然而,大多数研究表明,拟杆菌因内毒素而表现出促炎特性,并影响细胞因子的产生,从而导致炎症性肠病^[47]。总的来说,相对正常组,TBDNs 的部分微生物发生了显著变化,但其对小鼠生理作用的影响是否存在因果关系仍需进一步验证、探明。

3 结论

本文通过差速离心结合 PEG 沉淀法从苦荞中分离得到 TBDNs。TBDNs 呈典型的茶托型囊泡结构,平均粒径为 182.8 nm,粒径主峰在 162.8 nm。考察了正常饮食条件下添加 TBDNs 对小鼠生理生化及免疫的影响。结果表明,相对正常饮食组,TBDNs 组小鼠体重、甘油三酯(TG)、尿酸(UA)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)显著下降($P<0.01$);天冬氨酸氨基转移酶(AST)、胆固醇(TC)、高密度脂蛋白(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C)以及肌酐(CREA)水平均未发生显著性变化($P>0.05$);其它组织学指标、肠道屏障以及免疫组化(CD4、F480、MPO)指标未见显著改变($P>0.05$)。肠道菌群分析发现,TBDNs 的摄入还能提高肠道中一些有益菌如乳杆菌属 *Lactobacillus*、苏黎世杆菌属 *Turicibacter* 和 *Lachnospirillum* 的水平。综上所述,TBDNs 的摄入对小鼠整体生理健康无显著影响,少量指标的变化是否与肠道微生态改变有关尚需验证,其生理意义亦需进一步阐明。未来可进一步加大摄入浓度,对 TBDNs 的吸收过程及引起的代谢变化进行深入研究。

© The Author(s) 2025. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

[1] 彭镡心. 基于调节糖脂代谢效应的苦荞资源品质研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2019. [PENG Lianxin. Study on the quality of tartary buckwheat resources based on the effect of regulating glucolipid metabolism[D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2019.]

[2] 刘钰. 苦荞来源的纳米颗粒对肠道微生物的影响及发酵饮料的研发[D]. 成都: 成都大学, 2022. [LIU Yu. Effect of tartary buckwheat-derived nanoparticles (TBDNs) on gut microbiota and development of fermented beverages[D]. Chengdu: Chengdu Uni-

versity, 2022.]

[3] ZOU L, WU D, REN G, et al. Bioactive compounds, health benefits, and industrial applications of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*)[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023, 63(5): 657-673.

[4] STEWART L K, WANG Z, RIBNICKY D, et al. Failure of dietary quercetin to alter the temporal progression of insulin resistance among tissues of C57BL/6J mice during the development of diet-induced obesity[J]. *Diabetologia*, 2009, 52(3): 514-523.

[5] JU S, MU J, DOKLAND T, et al. Grape exosome-like nanoparticles induce intestinal stem cells and protect mice from DSS-induced colitis[J]. *Molecular Therapy*, 2013, 21(7): 1345-1357.

[6] PÉREZ-BERMÚDEZ P, BLESÁ J, SORIANO J M, et al. Extracellular vesicles in food: Experimental evidence of their secretion in grape fruits[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017, 98: 40-50.

[7] MU J, ZHUANG X, WANG Q, et al. Interspecies communication between plant and mouse gut host cells through edible plant derived exosome-like nanoparticles[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2014, 58(7): 1561-1573.

[8] ZHANG M, VIENNOIS E, PRASAD M, et al. Edible ginger-derived nanoparticles: A novel therapeutic approach for the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer[J]. *Biomaterials*, 2016, 101: 321-340.

[9] MAN F, MENG C, LIU Y, et al. The study of ginger-derived extracellular vesicles as a natural nanoscale drug carrier and their intestinal absorption in rats[J]. *AAPS PharmSciTech*, 2021, 22(6): 206.

[10] BERGER E, COLOSETTI P, JALABERT A, et al. Use of nanovesicles from orange juice to reverse diet-induced gut modifications in diet-induced obese mice[J]. *Molecular Therapy Methods & Clinical Development*, 2020, 18: 880-892.

[11] 赵婉均. 蓝莓外泌体样纳米颗粒对肥胖小鼠肝细胞氧化应激的调节作用及机制研究[D]. 重庆: 重庆理工大学, 2021. [ZHAO Wanjun. Blueberry-derived exosomes-like nanoparticles antagonize oxidative stress and its associated molecular mechanisms in the hepatocytes of HFD-fed mice[D]. Chongqing: Chongqing University of Technology, 2021.]

[12] LIU Y, REN C, ZHAN R, et al. Exploring the potential of plant-derived exosome-like nanovesicle as functional food components for human health: A review[J]. *Foods*, 2024, 13(5): 712.

[13] LIU Y, TAN M L, ZHU W J, et al. *In vitro* effects of tartary buckwheat-derived nanovesicles on gut microbiota[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(8): 2616-2629.

[14] SURESH A P, KALARIKKAL S P, PULLAREDDY B, et al. Low pH-based method to increase the yield of plant-derived nanoparticles from fresh ginger rhizomes[J]. *ACS Omega*, 2021, 6(27): 17635-17641.

[15] 李琰. 白藜芦醇通过调节肠道菌群和下调 PPAR 信号通路治疗酒精性脂肪肝的机制研究[D]. 辽宁: 中国医科大学, 2022. [LI Yan. Study on the mechanism of resveratrol in the treatment of alcoholic fatty liver in mice by regulating gut microbiota and down regulating PPAR signaling pathway[D]. Liaoning: China Medical University, 2022.]

[16] PENG L, ZHANG Q, ZHANG Y, et al. Effect of tartary buckwheat, rutin, and quercetin on lipid metabolism in rats during high dietary fat intake[J]. *Food Science & Nutrition*, 2020, 8(1): 199-213.

[17] 董志忠. 全谷物类产品的营养健康意义及产业发展机会[C]//粮食食品与营养健康产业科技发展论坛暨行业发展峰会,

2016. [DONG Zhizhong. The nutritional health significance and industrial development opportunities of whole grain products [C]//Conference on Grain Food and Nutritional Health Industry Development Technology Forum and Industry Development Summit, 2016.]
- [18] KONG C, YAN X, LIU Y, et al. Ketogenic diet alleviates colitis by reduction of colonic group 3 innate lymphoid cells through altering gut microbiome[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021, 6(1): 154.
- [19] XIE Z, XIE T, LIU J, et al. Glucokinase inactivation ameliorates lipid accumulation and exerts favorable effects on lipid metabolism in hepatocytes[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(5): 4315.
- [20] LU F, LI Y, WANG X, et al. Early-life polyphenol intake promotes *Akkermansia* growth and increase of host goblet cells in association with the potential synergistic effect of *Lactobacillus*[J]. *Food Research International (Ottawa, Ont)*, 2021, 149: 110648.
- [21] BORGONOVI T F, VIRGOLIN L B, JANZANTTI N S, et al. Fruit bioactive compounds: Effect on lactic acid bacteria and on intestinal microbiota[J]. *Food Research International (Ottawa, Ont)*, 2022, 161: 111809.
- [22] MIAO J, CUI H T, WANG L, et al. Effects of evodiamine on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis mice based on modulating gut microbiota[J]. *Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases*, 2021, 39(6): 401–406.
- [23] PENG M, WANG L, SU H, et al. Ginsenoside Rg1 improved diabetes through regulating the intestinal microbiota in high-fat diet and streptozotocin-induced type 2 diabetes rats[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2022, 46(10): e14321.
- [24] CAI Y Y, HUANG F Q, LAO X, et al. Integrated metagenomics identifies a crucial role for trimethylamine-producing *Lachnospirillum* in promoting atherosclerosis[J]. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 2022, 8(1): 11.
- [25] WANG G, ZHANG Y, ZHANG R, et al. The protective effects of walnut green husk polysaccharide on liver injury, vascular endothelial dysfunction and disorder of gut microbiota in high fructose-induced mice[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 162: 92–106.
- [26] LLOYD-PRICE J, ARZE C, ANANTHAKRISHNAN A N, et al. Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases[J]. *Nature*, 2019, 569(7758): 655–662.
- [27] ZHENG H, LIANG H, WANG Y, et al. Altered gut microbiota composition associated with eczema in infants[J]. *PloS One*, 2016, 11(11): e0166026.
- [28] AZZOUEZ D, OMARBEKOVA A, HEGUY A, et al. Lupus nephritis is linked to disease-activity associated expansions and immunity to a gut commensal[J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2019, 78(7): 947–956.
- [29] BREBAN M, TAP J, LEBOME A, et al. Faecal microbiota study reveals specific dysbiosis in spondyloarthritis[J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2017, 76(9): 1614–1622.
- [30] CHUA H H, CHOU H C, TUNG Y L, et al. Intestinal dysbiosis featuring abundance of *Ruminococcus gnavus* associates with allergic diseases in infants[J]. *Gastroenterology*, 2018, 154(1): 154–167.
- [31] HUANG C, LI Y, FENG X, et al. Distinct gut microbiota composition and functional category in children with cerebral palsy and epilepsy[J]. *Frontiers in Pediatrics*, 2019, 7: 394.
- [32] GRAHNEMO L, NETHANDER M, COWARD E, et al. Cross-sectional associations between the gut microbe *Ruminococcus gnavus* and features of the metabolic syndrome[J]. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 2022, 10(7): 481–483.
- [33] LUKIĆ I, GETSELT D, ZIV O, et al. Antidepressants affect gut microbiota and *Ruminococcus flavefaciens* is able to abolish their effects on depressive-like behavior[J]. *Translational Psychiatry*, 2019, 9(1): 133.
- [34] WANG L, CHRISTOPHERSEN C T, SORICH M J, et al. Increased abundance of *Sutterella* spp. and *Ruminococcus torques* in feces of children with autism spectrum disorder[J]. *Molecular Autism*, 2013, 4(1): 42.
- [35] HENKE M T, KENNY D J, CASSILLY C D, et al. *Ruminococcus gnavus*, a member of the human gut microbiome associated with Crohn's disease, produces an inflammatory polysaccharide[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(26): 12672–12677.
- [36] MURUGESAN S, ULLOA-MARTÍNEZ M, MARTÍNEZ-ROJANO H, et al. Study of the diversity and short-chain fatty acids production by the bacterial community in overweight and obese Mexican children[J]. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2015, 34(7): 1337–1346.
- [37] VERDAM F J, FUENTES S, de JONGE C, et al. Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity[J]. *Obesity (Silver Spring, Md)*, 2013, 21(12): E607–15.
- [38] KASAI C, SUGIMOTO K, MORITANI I, et al. Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing[J]. *BMC Gastroenterology*, 2015, 15: 100.
- [39] 刘巧红, 赵瑜, 胡义扬. 饮食对非酒精性脂肪性肝病肠道微生物菌型相关菌群的影响[J]. *临床肝胆病杂志*, 2021, 37(4): 4.
- [40] LIU Q H, ZHAO Y, HU Y Y. Effect of diet on enterotype-related gut microbiota in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Journal of Clinical Hepatol*, 2021, 37(4): 4.]
- [41] KULATHUNGA J, SIMSEK S. A review: Cereals on modulating the microbiota/metabolome for metabolic health[J]. *Current Nutrition Reports*, 2022, 11(3): 371–385.
- [42] MARCELINO G, HIANE P A, FREITAS K C, et al. Effects of olive oil and its minor components on cardiovascular diseases, inflammation, and gut microbiota[J]. *Nutrients*, 2019, 11(8): 1826.
- [43] TORAL M, ROBLES-VERA I, de LA VISITACIÓN N, et al. Role of the immune system in vascular function and blood pressure control induced by faecal microbiota transplantation in rats[J]. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 2019, 227(1): e13285.
- [44] ZHANG L, OUYANG Y, LI H, et al. Metabolic phenotypes and the gut microbiota in response to dietary resistant starch type 2 in normal-weight subjects: A randomized crossover trial[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 4736.
- [45] STOJANOV S, BERLEC A, ŠTRUKELJ B. The influence of probiotics on the Firmicutes/Bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(11): 1715.
- [46] ZAFAR H, SAIER M H. Gut *Bacteroides* species in health and disease[J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1–20.
- [47] YOSHIDA N, EMOTO T, YAMASHITA T, et al. *Bacteroides vulgatus* and *Bacteroides dorei* reduce gut microbial lipopolysaccharide production and inhibit atherosclerosis[J]. *Circulation*, 2018, 138(22): 2486–2498.
- [48] CAO Y, WANG Z, YAN Y, et al. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* promotes intestinal inflammation and malignancy by inhibiting exosomes-packaged miR-149-3p[J]. *Gastroenterology*, 2021, 161(5): 1552–1566.