

微生物转化影响不同内源雌激素水平大鼠粪便雌马酚含量和菌群结构

张逊¹, 郑卫江¹, 黄莎娜¹, 姚文^{1,2*}

¹南京农业大学动物科技学院消化道微生物研究室;

²农业部生理生化重点实验室, 南京 210095

摘要:雌马酚(Equol)是肠道中特定细菌转化大豆异黄酮的产物,与其前体大豆苷元(Daidzein)相比,雌马酚具有更强的生物学活性。【目的】研究口服雌马酚产生菌对大鼠转化大豆苷元能力的可能促进作用及内源雌激素对大鼠肠道菌群的可能影响。【方法】使用平均体重为 211 ± 9 g的卵巢摘除和假手术雌性大鼠各30只,分别随机分为5组,并灌胃蒸馏水、雌二醇、大豆苷元、雌马酚和大豆苷元+雌马酚产生菌ZX7。【结果】从灌胃第2天开始,接受大豆苷元后大鼠粪样中始终具有较高水平的雌马酚,显著高于对照和雌二醇组($P < 0.01$);灌胃大豆苷元+雌马酚产生菌ZX7的大鼠和直接灌胃雌马酚的大鼠在粪样雌马酚含量上十分接近;DGGE图谱的PCA分析显示,卵巢摘除大鼠和假手术大鼠粪便菌群存在明显差异;大鼠粪便拟杆菌门细菌数量与粪样中雌马酚水平显著正相关。【结论】大鼠肠道固有菌群中可能存在能够将大豆苷元转化为雌马酚的细菌,利用外源菌株改变大鼠雌马酚产生能力具有一定的可行性,不同的内源雌激素水平可能影响大鼠肠道菌群结构,拟杆菌门细菌可能在大豆苷元的生物转化过程中起着十分重要的作用。

关键词:大鼠,大豆苷元,雌马酚,雌马酚产生菌ZX7,粪样细菌

中图分类号:Q938 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2012)07-0866-09

雌马酚(Equol)是肠道中特定细菌代谢大豆异黄酮的产物^[1],与其前体大豆苷元(Daidzein)相比,雌马酚具有更强的生物活性^[2-3]。人类肠道中雌马酚产生菌种类和数量的差异可能解释了不同个体接受大豆异黄酮干预后疗效的差别——“雌马酚假说”^[4]。动物肠道微生物较强的雌马酚产生能力同样有利于大豆苷元生物活性的发挥^[5]。

引入外源雌马酚产生菌有可能改变受体动物的雌马酚产生能力。无菌小鼠摄入“雌马酚产生者”(Equol Producer)的肠道细菌后,其尿样中可检出雌

马酚^[1];接种“雌马酚产生者”的肠道细菌后,“非雌马酚产生者”(Non-Equol Producer)粪样在体外培养中也可以检出雌马酚^[6]。

雌马酚及其前体大豆苷元都是雌二醇结构类似物,因受体动物自身雌激素水平的差异而表现为雌激素活性和抗雌激素活性。引入外源细菌改变动物雌马酚产生能力是否也会受到受体动物自身雌激素水平的影响,迄今未见报道,而这对于利用外源细菌改变动物雌马酚产生能力的研究和应用至关重要。因此本试验以灌胃的方式给予卵巢摘除和假手术雌

基金项目:国家自然科学基金(30771570);教育部留学回国人员科研启动基金(G0201100315);教育部博士点基金(B0201100681)

* 通信作者。Tel: +86-25-84395523; Fax: +86-25-84395314; E-mail: yaowen67jp@njau.edu.cn

作者简介:张逊(1982-),男,重庆市人,博士研究生,主要从事猪肠道微生物与营养的研究。E-mail: zhangxunnj@gmail.com

收稿日期:2011-02-23;修回日期:2012-03-26

性大鼠大豆苷元、雌马酚及大豆苷元 + 雌马酚产生菌 ZX7, 通过高效液相色谱 (HPLC) 分析不同日龄大鼠粪样中雌马酚的含量变化, 使用变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 和实时定量 PCR (Real-time PCR) 技术追踪大鼠不同日龄细菌种类和数量的变化, 以了解大豆苷元、雌马酚及雌马酚产生菌 ZX7 对不同内源雌激素水平大鼠微生物区系的影响。

1 材料和方法

1.1 试验动物及日粮

1.1.1 试验动物: 60 日龄雌性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 60 只, 平均体重 211 ± 9 g (南京军区总医院试验动物中心)。

1.1.2 试验日粮: 试验日粮配方参照美国分析化学家协会 (AOAC) 试验大鼠饲料配方及试验大鼠合成饲料配方 (AIN-93) [7] 进行设计, 使用酪氨酸替代豆粕制成无豆日粮 (Soy-free diet) 以减少饲料中异黄酮背景。日粮的配方组成和营养水平见表 1。

表 1 无豆基础日粮的配方组成及营养水平

Table 1 Formula composition and nutrient level of soy-free diet

Formula composition g/100g		Nutrient level/100g	
Casein	20	Dry matter	89.17g
Lard	6	Ash	6.71g
Starch	62	Ether extract	5.50g
Sucrose	6	Total energy	1697.1KJ
Cellulose	1		
Mixed inorganic salt*	3.5		
Mixed vitamins**	1.5		

* Mixed inorganic salt: Calcium Hydrophosphate 500g, Sodium Chloride 74g, Potassium Citrate 220g, Potassium Sulfate 52g, Magnesium Oxide 24g, Manganese Carbonate 3.5g, Zinc Carbonate 1.6g, Ferric Citrate 60g, Basic Cupric Carbonate 0.3g, Potassium Iodate 0.01g, Sodium Selenite 0.01g, Chromic Potassium Sulfate 0.55g, add Sucrose to 1000g. ** Mixed vitamins: Vitamin B1 600mg, Vitamin B2 600mg, Vitamin B5 3000 mg, Vitamin B6 700 mg, Vitamin B12 110mg, Calcium Pantothenate 1600 mg, Folic Acid 200 mg, Biotin D 20mg, Vitamin A 40000 IU, Vitamin D3 215mg, Vitamin E 5000mg, Vitamin K 510mg, add Sucrose to 1000g.

1.2 试验菌株和制备

1.2.1 试验菌株: 本研究室分离自猪粪的雌马酚产生菌株 ZX7 (*Clostridium bifermentans*, CGMCC NO. 1995)。

1.2.2 菌株制备: ZX7 在 BHI 肉汤 (Merck, 德国) 中培养 12 h, 将培养物以 $3000 \times g$ 进行离心, 得到的

湿菌体。

1.3 试验动物准备及分组设计

1.3.1 试验动物准备: 所有大鼠饲喂无豆日粮一周以消除日粮来源的异黄酮影响。适应期第 7 天, 随机对 30 只大鼠实施双侧卵巢摘除术 (Ovariectomy, OVX), 对另 30 只进行假手术 (SHAM OVX), 术后 1 周恢复。

1.3.2 试验分组: 术后一周对卵巢摘除及假手术大鼠分别随机分组, 按不同处理放入笼中分别喂养。具体分组情况如表 2 所示。

表 2 试验设计

Table 2 Experimental design

Animal	Group	Replicates	Treatment
OVX	Control	6 (6)	Distilled Water 1mL
or	Estradiol	6 (5) *	Estradiol 0.2mg/day
SHAM	Daidzein	6 (6)	Daidzein 10mg/day
OVX	Equol	6 (6)	Equol 10mg/day
rats	Daidzein + ZX7	6 (6)	Daidzein 10mg/day ZX7 100mg/Kg BW

* One of SHAM OVX rats under Estradiol treatment died during the experiment period.

1.3.3 给药方式: 所有处理均以等量灭菌蒸馏水溶液 (1 mL) 方式进行灌胃。对照组 (Control) 大鼠每天灌胃灭菌蒸馏水 1 mL, 雌二醇组 (Estradiol) 每天灌胃雌二醇 0.2 mg (> 98%, Sigma, 美国), 大豆苷元组 (Daidzein) 每天灌胃大豆苷元 10mg (> 98%, 农业部动物生理生化重点开放实验室), 雌马酚组 (Equol) 每天灌胃雌马酚 10 mg (> 94%, 南京莱尔生物化工有限公司), 大豆苷元 + 雌马酚产生菌组 (Daidzein + ZX7) 每天灌胃大豆苷元 10 mg, 并在试验第 1、2、3 日及 21 日时分别灌胃雌马酚产生菌 ZX7 1 mL (剂量 100 mg/Kg BW)。

1.4 样品采集与分析

1.4.1 样品采集: 灌胃当天 (第 1 天)、第 2 天、第 21 天及屠宰当天 (第 42 天) 采集所有大鼠粪便, -20°C 保存。

1.4.2 高效液相色谱 (HPLC) 法检测粪样中雌马酚含量: 0.2 克大鼠粪样用乙醚萃取, 待乙醚挥发后用 1 mL 乙醇/二甲亚砜 (50/50, V/V) 溶解并 4°C 保存。HPLC (Waters 600 controller, 美国) 流动相: 乙腈/甲醇/水 = 20/30/50 (V/V)。流速: 0.8 mL/min。C18 色谱柱 (150 × 4.6 mm, 4 μm , Waters, 美国) 的柱温: 30°C 。进样量: 10 μL 。用 Waters 2487 Dual λ

Absorbance Detector 双波长检测器, 在 205 nm 波长处检测雌马酚。

1.4.3 PCR-DGGE 分析粪样细菌区系^[8]: 0.3 g 大鼠粪样珠磨法裂解细胞后, 用酚和氯仿/异戊醇 (24.5/1, V/V) 提取总 DNA。用 U968-GC 和 L1401 对细菌 16S rRNA 基因的 V6-V8 区进行 PCR (Biometra, 德国) 扩增。PCR 反应体系包括 1 × buffer、2.5 μmol/L Mg²⁺、2.5 U TaKaLR TaqTM (TaKaRa, 大连)、0.75 μmol/L dNTP、10 ng 模板 DNA 及上下游引物各 0.5 μmol/L。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 s, 56℃ 20 s, 68℃

40 s, 共 35 个循环; 68℃ 延伸 5 min。DGGE (D code, Bio-Rad, 美国) 使用 8% 聚丙烯酰胺凝胶 (含丙酰胺、二丙酰胺、尿素、甲酰胺、甘油), 尿素浓度梯度为 38% - 48%。硝酸银染色后的凝胶使用 GS-800 灰度扫描仪 (Bio-Rad, 美国) 扫描成图。应用软件 Gel Compar 2 (BIO-RAD, 美国) 对 PCR-DGGE 图谱进行数字化处理及相关分析。

1.4.4 Real-time PCR 分析粪样主要细菌数量的变化: 本研究选用的细菌特异性引物由上海英俊生物技术有限公司合成, 详细序列见表 3。

表 3 定量 PCR 引物

Table 3 PCR primers for Real-time PCR

Target group	Primer	Sequence (5'→3')	Reference
Total bacteria	Bact1369	CGGTGAATACGTTTCYCGG	Suzukiet al. [9]
	Prok1492	GGWTACCTTGTTACGACTT	Suzukiet al. [9]
Bacteroidetes	Bact934F	GGARCATGTGGTTTAATTCGATGAT	Guo et al. [10]
	Bact1060R	AGCTGACGACAACCATGCAG	Guo et al. [10]
Firmicutes	Firm934F	GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA	Guo et al. [10]
	Firm1060R	AGCTGACGACAACCATGCAG	Guo et al. [10]

R = A/G, Y = C/T, W = A/T

分别以 *Lactobacillus sobris* S9、*Bacteroides thetaiotaomicron* 和 *Clostridium leptum* 纯菌作为总细菌、拟杆菌和厚壁菌的核酸模板标品进行 PCR 反应, 用 Nanodrop 3000 (Thermo, 美国) 测定纯化后 PCR 产物浓度, 按照公式:

$$\frac{\text{PCR 产物浓度}}{600 (\text{碱基对平均分子量}) \times \text{扩增片段长度}} \times 6.02 \times 10^{23} (\text{阿佛加德罗常数})$$

计算出 1 μL 标品所含有的细菌 16S rRNA 基因拷贝数 (Copies/μL), 将标品连续 10 倍稀释 (不少于 5 个稀释梯度), 进行实时定量 PCR 反应, 以构建绝对定量标准曲线。以粪样 DNA 为模板, 分别以总细菌、拟杆菌和厚壁菌特异引物进行 Real-time PCR 反应, 根据相应标准曲线及样品稀释情况计算出样品中不同种类细菌的数量。实时定量 PCR (ABI 7300, Applied Biosystems, 美国) 采用 20 μL 体系, 包括 DNA 20 ng, 上下游引物各 6 ng, FastStart® Universal SYBR Green Master (Roche, 德国) 10 μL。反应步骤: 50℃ 2 min, 95℃ 10 min 激活 FastStart® Universal SYBR Green Master; 95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 40 个循环。

1.5 数据统计

HPLC 和 Real-time PCR 检测中来自同一动物的样品均重复测定 3 次以减少操作误差。所获得数据经 Microsoft Excel 初步整理后, 使用 SPSS18.0 软件进行二因素方差分析, 结果以平均值 ± 标准差 (Mean ± SD) 形式表示。

2 结果

2.1 灌胃大豆苷元、雌马酚及大豆苷元 + 雌马酚产生菌 ZX7 后卵巢摘除及假手术大鼠粪样中雌马酚含量变化情况

如图 1 可知, 灌胃当天 (Day 1), 无论卵巢摘除与否, 各组粪样中雌马酚含量无显著差别 ($P > 0.05$); 而灌胃第 2 天 (Day 2), 无论卵巢摘除与否, 接受大豆苷元及雌马酚处理大鼠粪样中雌马酚含量显著高于对照 ($P < 0.05$), 而雌二醇组与对照间仍无显著差别 ($P > 0.05$); 雌马酚处理卵巢摘除大鼠粪样雌马酚含量显著高于大豆苷元处理 ($P < 0.05$); 假手术大鼠粪样中雌马酚水平极显著高于卵巢摘除大鼠 ($P < 0.01$)。试验中期 (Day 21) 及试验结束 (Day 42) 时卵巢摘除大鼠与假手术大鼠粪样中雌马酚含量无显著差异 ($P > 0.05$), 但接受大豆

昔元及雌马酚处理大鼠粪样中雌马酚含量均显著高于对照 ($P < 0.01$)。

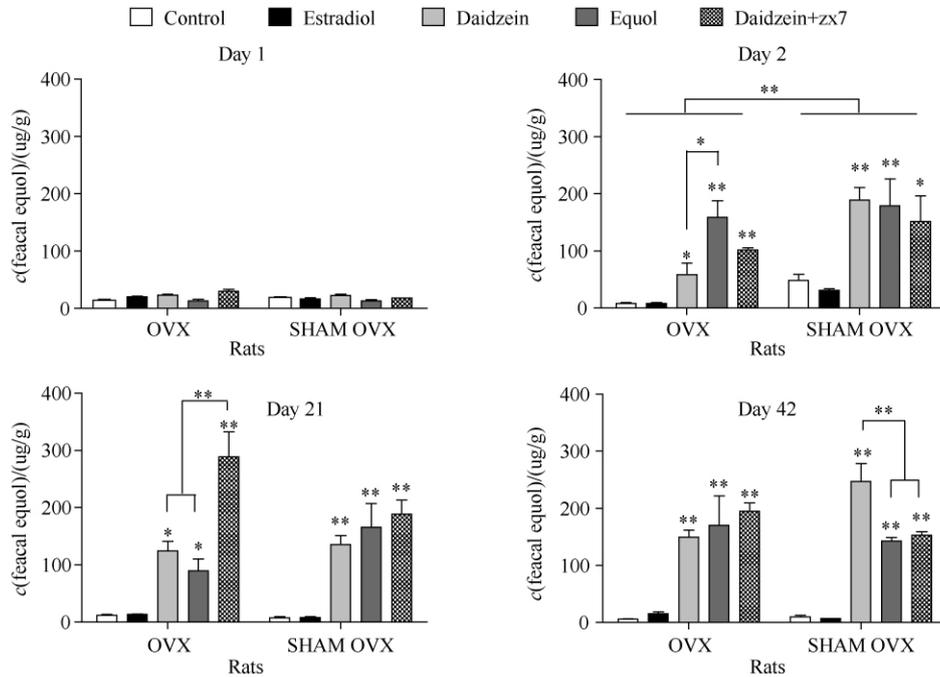


图1 接受大豆昔元、雌马酚及大豆昔元+雌马酚产生菌 ZX7 处理大鼠粪样中雌马酚含量

Fig. 1 Fecal equol concentration of rats treated with Daidzein, Equol and Daidzein + ZX7. * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$.

2.2 大豆昔元、雌马酚及大豆昔元+雌马酚产生菌 ZX7 对卵巢摘除及假手术大鼠粪样菌群的影响

由不同处理卵巢摘除和假手术大鼠粪便菌群 DGGE 图谱可见 (图 2), 代表不同种类细菌的条带数目、位置及灰度均体现出一定差异, 这表明卵巢摘除手术和不同处理对大鼠粪样中细菌的种类和数量存在一定的影响。扫描 DGGE 图谱, 将不同泳道中的条带数目、位置及灰度等特征值转化为多元数据集, 采用主成分分析 (Principal Components Analysis, PCA) 比较卵巢摘除手术及不同处理对大鼠肠道细菌区系的影响。

PCA 分析表明, 卵巢摘除和假手术大鼠粪样中的优势菌群组成可以在主因素平面上被区分开 (图 3), 与假手术大鼠相比, 卵巢摘除大鼠各处理间相似性更低 (标记在主因素平面上分布更为分散)。

对不同采样时间粪样 DGGE 图谱分别进行 PCA 分析 (图 4) 发现, 灌胃第 1 天 (卵巢摘除手术后 1 周) 时卵巢摘除和假手术大鼠粪样中优势菌群的组成即已存在较为明显的差异, 在第 2、21 及 42 天时这种差异一直存在; 第 42 天时不同处理之间表现出更加明显的差异, 这在卵巢摘除大鼠中尤其

明显。无论卵巢摘除与否, 雌马酚处理 (■) 大鼠粪样中的优势菌群组成与对照 (●) 之间始终存在明显差异; 而雌二醇 (◆) 处理后卵巢摘除大鼠和假手术大鼠粪样中优势菌群的组成具有较高的相似性。

2.3 灌胃大豆昔元、雌马酚及大豆昔元+雌马酚产生菌 ZX7 后不同时间点大鼠粪样中厚壁菌及拟杆菌数量的变化

如图 5 所示, 与对照相比, 灌胃大豆昔元、雌马酚及大豆昔元+雌马酚产生菌 ZX7 的卵巢摘除大鼠粪样中厚壁菌门细菌比例明显低于对照, 在灌胃雌马酚的大鼠中尤为明显; 在假手术大鼠中, 灌胃雌马酚和 大豆昔元+雌马酚产生菌 ZX7 的大鼠粪样中厚壁菌门的比例也低于对照。

灌胃大豆昔元、雌马酚及大豆昔元+雌马酚产生菌 ZX7 大鼠粪样中拟杆菌门细菌相对丰度均高于对照; 在卵巢摘除大鼠中灌胃大豆昔元+雌马酚产生菌 ZX7 的大鼠粪样中拟杆菌门细菌相对丰度接近对照的 5 倍, 而在假手术大鼠中, 灌胃大豆昔元的大鼠粪样中拟杆菌门细菌相对丰度达到对照的 5 倍以上。

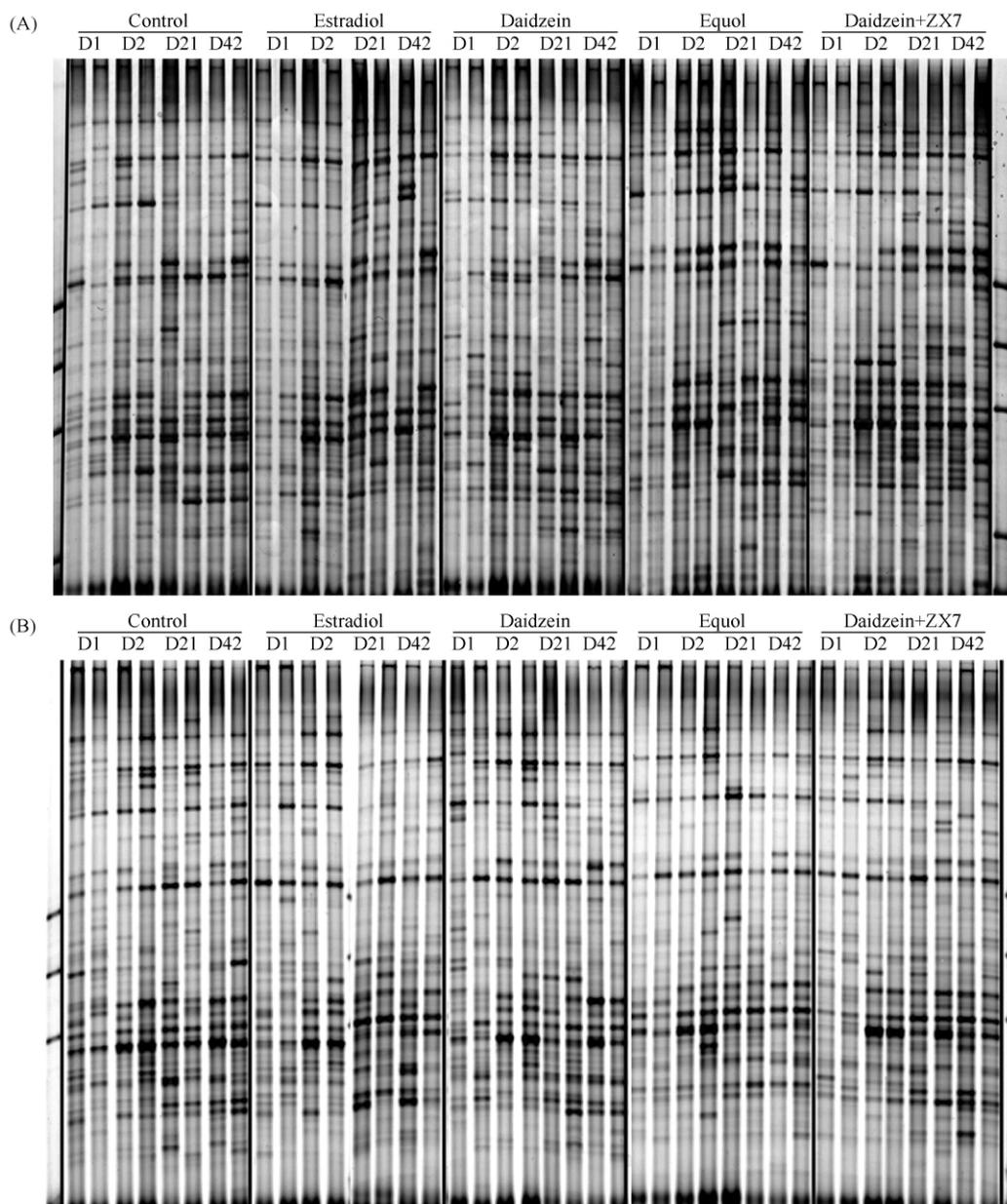


图 2 灌胃大豆苷元、雌马酚及大豆苷元 + 雌马酚产生菌 ZX7 的大鼠粪样细菌 DGGE 图谱

Fig. 2 DGGE profile of fecal bacterial from rats treated with Daidzein, Equol and Daidzein + ZX7. A: OVX rats, B: SHAM-OVX rats.

进一步对大鼠粪样中的雌马酚含量和厚壁菌、拟杆菌数量进行相关性统计分析发现,大鼠粪样中的雌马酚含量和拟杆菌门细菌数量(Log(copies/g))呈极显著正相关(Pearson Correlation Index = 0.508, $P < 0.01$) (图 6),在卵巢摘除大鼠中两者相关系数为 0.668 ($P < 0.01$),而在假手术大鼠中两者相关系数为 0.412, ($P < 0.05$)。

3 讨论

大豆异黄酮主要包括染料木素和大豆素,可预防和改善多种疾病^[1]。近年来,大量研究表明大豆素的生物作用一定程度上归因于其摄入体内后转化成雌马酚的效率^[12]。大豆素在肠道内由特定菌群

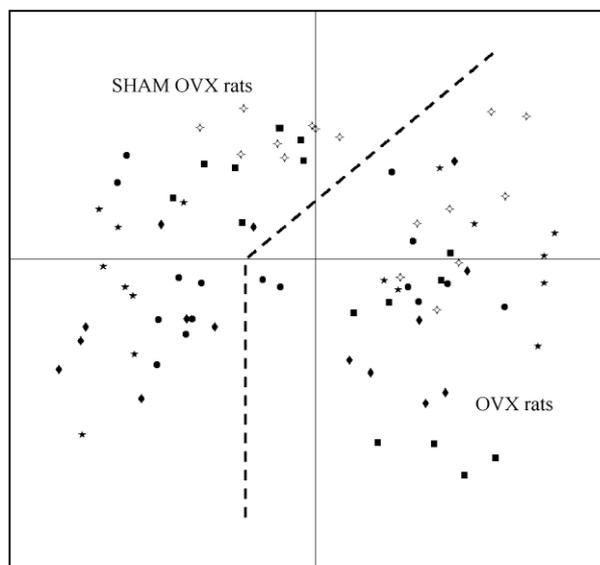


图3 对照(●)、雌二醇(◆)、大豆苷元(★)、雌马酚(■)和 大豆苷元 + 雌马酚产生菌 ZX7(◇)处理中大鼠粪样细菌 DGGE 图谱的 PCA 分析

Fig. 3 PCA analysis of the fecal bacterial DGGE profiles from rats treated by Control (●), Estradiol (◆), Daidzein (★), Equol (■) and Daidzein + ZX7 (◇).

转化为雌马酚^[1, 13], 这些特定菌群在人类中存在十分明显的个体差异, 仅有 20% - 30% 的西方成年人在摄入豆制品后能够从尿样中检测到雌马酚, 而亚洲人的这一比例为 50% - 60%^[14], 这一差异可能与食物来源的大豆异黄酮摄入量及肠道菌群结构差异有关。

利用外源菌株改变动物雌马酚产生能力的研究报道非常有限, Decroos 等^[6]在体外肠道模拟系统中将雌马酚产生者粪样接种到原来不能产生雌马酚个体的粪样中时, 培养体系中有雌马酚检出; Bowey 等^[1]给无菌小鼠灌喂雌马酚产生者粪便培养物后, 尿样中可以检测出雌马酚。本试验以经口灌胃的方式给予大鼠大豆苷元、雌马酚及大豆苷元 + 雌马酚产生菌 ZX7 处理, 通过高效液相色谱 (HPLC) 分析不同日龄大鼠粪样中雌马酚含量发现, 从灌胃第 2 天开始, 接受大豆苷元后大鼠粪样中始终具有较高水平的雌马酚, 显著高于对照和雌二醇组 ($P < 0.01$), 提示大鼠肠道固有菌群中可能存在能够转化大豆苷元生成雌马酚的细菌; 而灌胃大豆苷元 + 雌马酚产生菌 ZX7 的大鼠和直接灌胃雌马酚的大鼠在粪样雌马酚含量上十分接近, 这说明了利用外源菌株改变动物雌马酚产生能力的可行性, 但由于

大鼠肠道中可能原本就存在雌马酚产生菌, 该结果仍需要进一步通过无菌动物实验来验证。

文献表明肠道中的雌马酚仅由特定细菌代谢生成, 外源添加的大豆苷元和雌马酚能否改变肠道微生物菌群结构, 迄今未见报道。因此本研究中我们采用变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 和实时荧光定量 PCR 技术研究经口灌胃的大豆苷元、雌马酚及大豆苷元 + 雌马酚产生菌 ZX7 对大鼠肠道微生物区系结构和数量的影响。本试验中, 对所获得 DGGE 图谱的 PCA 分析显示, 卵巢摘除大鼠和假手术大鼠肠道菌群存在明显差异; 由于卵巢摘除手术会造成大鼠内源雌激素水平下降, 这提示哺乳动物肠道微生物组成可能受到内源雌激素水平变化的影响; 雌激素能够调控哺乳动物生殖道中微生物的组成^[15], 但对肠道微生物的直接作用尚无相关文献报道, 推测这种影响可能是通过雌激素对机体稳态的调节间接实现的; 而本试验中观察到的卵巢摘除大鼠中不同处理间肠道微生物区系差异较假手术大鼠中更明显则进一步表明了内源雌激素水平对肠道微生物组成存在影响。

Bolca 等^[16]研究人体中与雌马酚产生相关的细菌时发现肠道中雌马酚的产生与梭菌和真杆菌数量呈负相关, 而与硫酸盐还原菌数量呈正相关; 但迄今没有对雌马酚产生和肠道主要菌群 (门水平) 的相关性进行研究的报道。在本试验中, 灌胃雌马酚和 大豆苷元 + 雌马酚产生菌 ZX7 的大鼠粪样中厚壁菌门的比例均相对于对照有所降低, 而灌胃大豆苷元、雌马酚及大豆苷元 + 雌马酚产生菌 ZX7 的大鼠粪样中拟杆菌门细菌相对丰度均高于对照; 这表明大豆苷元和雌马酚均有促进拟杆菌门细菌生长的作用。这是否是 大豆异黄酮调节机体脂代谢的微生物机制尚有待于进一步的研究。

已有研究表明, 动物肠道内属于厚壁菌门的真杆菌属 (*Eubacterium*)^[17], 丁酸梭菌属 (*Butyrivibrio*)^[18], 乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)^[19] 和梭菌属 (*Clostridium*)^[20] 的一些细菌直接参与了大豆苷元的降解过程。而本试验发现, 大鼠粪样雌马酚含量和拟杆菌门细菌相对丰度呈极显著正相关, 这提示拟杆菌门的细菌也可能在肠道雌马酚的生物转化过程中扮演了十分重要的角色; 两者在卵巢摘除大鼠中的相关性及其显著程度均高于假手术大鼠进一步佐证了大鼠内源雌激素水平对肠道微生物组成的影响。

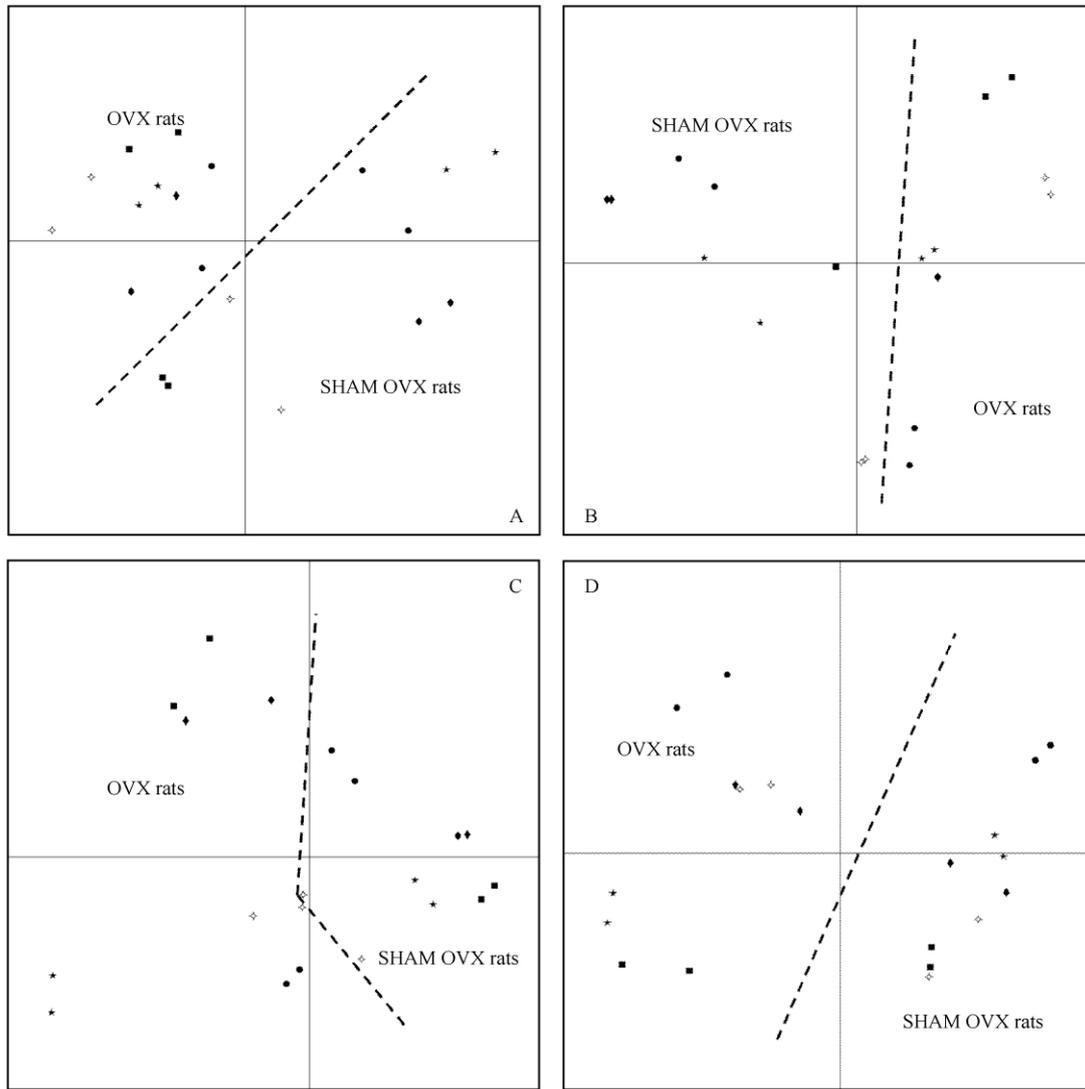


图 4 不同日龄对照(●)、雌二醇(◆)、大豆苷元(★)、雌马酚(■)和大豆苷元+雌马酚产生菌 ZX7(◇)处理大鼠粪样细菌 DGGE 图谱的 PCA 分析结果

Fig. 4 PCA analysis of the fecal bacterial DGGE profile from rats treated by Control (●), Estradiol (◆), Daidzein (★), Equol (■) and Daidzein + ZX7 (◇) on Day1, 2, 21 and 42. A. Day1, B. Day2, C. Day21 and D. Day42.

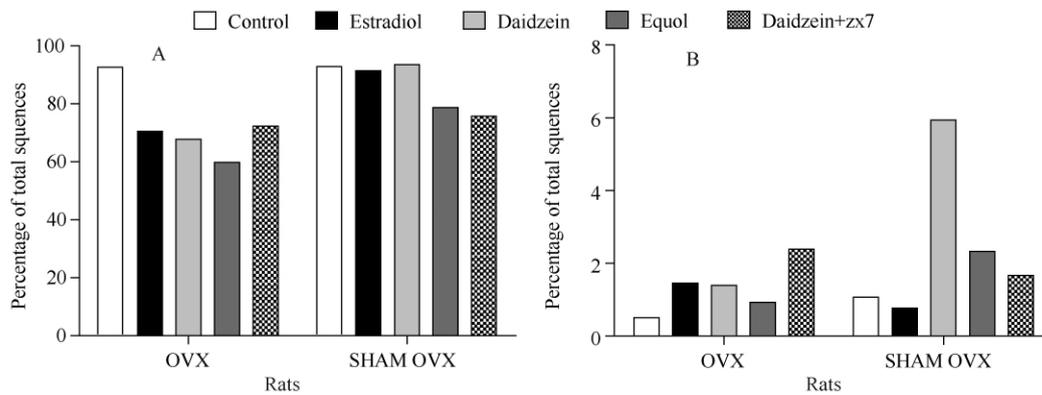


图 5 灌胃大豆苷元、雌马酚及大豆苷元+雌马酚产生菌 ZX7 后大鼠粪样厚壁菌门和拟杆菌门细菌的相对丰度

Fig. 5 Relative abundance of fecal Bacteroidetes and Firmicutes in the rats treated with Daidzein, Equol and Daidzein + ZX7. A: Firmicutes; B: Bacteroidetes.

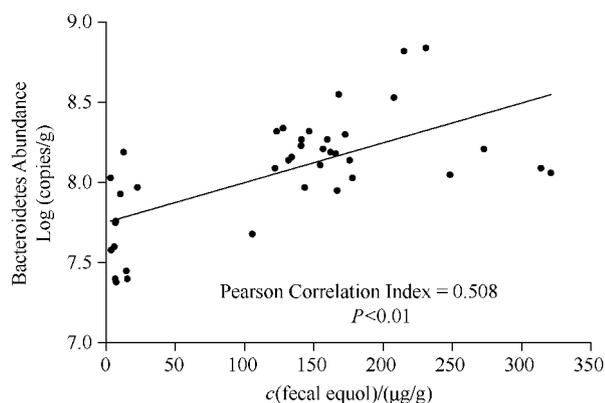


图6 大鼠粪样中雌马酚含量和拟杆菌门细菌丰度的相关性

Fig. 6 Correlation between fecal equol concentration and Bacteroidetes abundance rats.

综上所述,大鼠肠道固有菌群中可能存在转化大豆苷元生成雌马酚的细菌,利用外源菌株改变动物雌马酚产生能力具有一定的可行性,大鼠内源雌激素水平可能影响其肠道微生物组成,肠道拟杆菌门细菌在雌马酚的生物转化过程中可能起着十分重要的作用。

参考文献

- [1] Bowey E, Adlercreutz H, Rowland I. Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats. *Food and Chemical Toxicology*, 2003, 41: 631-636.
- [2] Possemiers S, Bolca S, Eeckhaut E, Depypere H, Verstraete W. Metabolism of isoflavones, lignans and prenylflavonoids by intestinal bacteria: producer phenotyping and relation with intestinal community. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 61: 372-383.
- [3] Larkin T, Price W, Astheimer L. The key importance of soy isoflavone bioavailability to understanding health benefits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2008, 48: 538-552.
- [4] Setchell K, Brown N, Lydeking-Olsen E. The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *The Journal of Nutrition*, 2002, 132: 3577-3584.
- [5] Yuan J, Wang J, Liu X. Metabolism of dietary soy isoflavones to equol by human intestinal microflora—implications for health. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2007, 51: 765-781.
- [6] Decroos K, Eeckhaut E, Possemiers S, Verstraete W. Administration of equol-producing bacteria alters the equol production status in the Simulator of the Gastrointestinal Microbial Ecosystem (SHIME). *The Journal of Nutrition*, 2006, 136: 946-952.
- [7] Reeves P, Nielsen F, Fahey G. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of Nutrition*, 1993, 123: 1939-1951.
- [8] 朱伟云, 姚文, 毛胜勇. 变性梯度凝胶电泳法研究断奶仔猪粪样细菌区系变化. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2003, 43: 503-508.
- [9] Suzuki M, Taylor L, DeLong E. Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66: 4605-4614.
- [10] Guo X, Xia X, Tang R, Wang K. Real-time PCR quantification of the predominant bacterial divisions in the distal gut of Meishan and Landrace pigs. *Anaerobe*, 2008, 4: 224-228.
- [11] Messina M. Insights gained from 20 years of soy research. *The Journal of Nutrition*, 2010, 140: 2289S-2295S.
- [12] Setchell K, Clerici C. Equol: pharmacokinetics and biological actions. *The Journal of Nutrition*, 2010, 140: 1363S-1368S.
- [13] Rafii F, Jackson L, Ross I, Heinze T, Lewis S, Aidoo A, Lyn-Cook L, Manjanatha M. Metabolism of daidzein by fecal bacteria in rats. *Comparative Medicine*, 2007, 57: 282-286.
- [14] Rowland I, Wiseman H, Sanders T, Adlercreutz H, Bowey E. Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. *Nutrition and Cancer*, 2000, 36: 27-32.
- [15] Larsen B, Markovetz A, Galask R. Role of estrogen in controlling the genital microflora of female rats. *Applied and Environmental Microbiology*, 1977, 34: 534-540.
- [16] Bolca S, Possemiers S, Herregat A, Huybrechts I, Heyerick A, De Vriese S, Verbruggen M, Depypere H, De Keukeleire D, Bracke M, De Henauw S, Verstraete W, Van de Wiele T. Microbial and dietary factors are associated with the equol producer phenotype in healthy postmenopausal women. *The Journal of Nutrition*, 2007, 137: 2242-2246.

- [17] Schneider H, Blaut M. Anaerobic degradation of flavonoids by *Eubacterium ramulus*. *Archives of microbiology*, 2000, 173: 71-75.
- [18] Krishnamurty H, Cheng K, Jones G, Simpson F, Watkin J. Identification of products produced by the anaerobic degradation of rutin and related flavonoids by *Butyrivibrio* sp. C3. *Canadian Journal of Microbiology*, 1970, 16: 759-767.
- [19] Decroos K, Vanhemmens S, Cattoir S, Boon N, Verstraete W. Isolation and characterisation of an equol-producing mixed microbial culture from a human faecal sample and its activity under gastrointestinal conditions. *Archives of microbiology*, 2005, 183: 45-55.
- [20] Schoefer L, Mohan R, Schwiertz A, Braune A, Blaut M. Anaerobic degradation of flavonoids by *Clostridium orbiseindens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69: 5849-5854.

Microbial conversion of daidzein affects fecal equol concentration and bacterial composition of rats with or without ovariectomy

Xun Zhang¹, Weijiang Zheng¹, Shana Huang¹, Wen Yao^{1,2*}

¹ College of animal science and technology, ² Key Laboratory of Animal Physiology and Biochemistry, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: Equol is the end metabolite of daidzein by certain intestinal bacteria, which has stronger bioactivity comparing with daidzein. **[Objective]** To evaluate the role of orally administrated equol-producing bacterium on increasing equol production and shifting intestinal microbiota of embracer animal. **[Methods]** In total 60 rats with or without ovariectomy at average bodyweight 211 ± 9 g were divided into 5 groups. The differences on equol concentration and bacterial composition were compared in rats orally treated with distilled water, estradiol, daidzein, equol and daidzein + ZX7. **[Results]** The fecal equol concentration in daidzein groups was significantly higher than that in control and estradiol groups. The fecal equol concentration in daidzein + ZX7 groups was comparable to that in equol groups. Principal Components Analysis (PCA) of fecal DGGE profiles showed clear difference of fecal microbiota between ovariectomy done or undone rats. Fecal population of Bacteroidetes showed strong correlation with fecal equol concentration. **[Conclusion]** Normal intestinal microbiota in rats might have the capacity to convert daidzein into equol. Dietary source of equol-producing bacterium ZX7 might have the possibility to increase the equol production of embracer animal. Endogenous estrogen concentration might shift the intestinal microbiota on rats. Bacteroidetes might have an important role on equol production.

Keywords: rats, daidzein, equol, equol-producing bacterium ZX7, fecal bacteria

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30771570), by the Scientific Research Foundation for Returned Scholars, Ministry of Education of China (G0201100315) and by the Doctoral Fund of Ministry of Education of China (B0201100681)

* Corresponding author. Tel: +86-25-84395523; Fax: +86-25-84395314; E-mail: yaowen67jp@njau.edu.cn

Received: 23 February 2012 / Revised: 26 March 2012