

• 医学与免疫生物技术 •

口服肝素与小鼠肠道菌群的相互作用

周雪¹, 王怡², 何东², 曾文², 张翀², 薛正莲¹, 邢新会²

1 安徽工程大学 生物与化学工程学院, 安徽 芜湖 241000

2 清华大学 化学工程系生物化工研究所 工业生物催化教育部重点实验室 合成与系统生物学中心, 北京 100084

周雪, 王怡, 何东, 等. 口服肝素与小鼠肠道菌群的相互作用. 生物工程学报, 2019, 35(9): 1736-1749.

Zhou X, Wang Y, He D, et al. Interaction between orally administrated heparin and intestinal microbiota in mice. Chin J Biotech, 2019, 35(9): 1736-1749.

摘要: 口服肝素药物的开发需要系统地理解口服肝素与肠道菌群之间的互作过程。通过荧光体视镜观察荧光素标记的肝素经小鼠口服后在体内的分布情况, 利用高效液相色谱法检测肝素在模拟胃肠液中的稳定性和体外培养肠道菌群模拟肠道菌对肝素的降解作用, 发现口服肝素主要分布在小鼠胃肠道内, 在体外模拟胃肠液条件下肝素结构稳定, 但能够被添加肝素的厌氧培养基培养后的肠道菌群降解。为了进一步揭示口服肝素对健康小鼠肠道菌群的影响, 利用 Illumina MiSeq 高通量测序技术测定口服肝素后 C57BL/6J 小鼠粪便菌群的 16S rRNA 序列, 与口服生理盐水的小鼠粪便菌群进行对比, 发现口服肝素的小鼠粪便菌群的生物多样性降低; 在门水平上, 菌群结构差异不显著; 而在属水平上, 别样杆菌属 *Alistipes*、副萨特氏菌属 *Parasutterella* 和艾克曼菌属 *Akkermansia* 相对丰度增高, 而嗜胆菌属 *Bilophila*、肠杆菌属 *Enterorhabdus*、瘤胃梭菌属 *Ruminiclostridium*、普雷沃氏菌科 *Prevotellaceae*_UCG_001、瘤胃梭菌属 *Ruminiclostridium*-9、拟杆菌属 *Bacteroides*、*Lachnoclostridium*、*Candidatus*_ *Saccharimonas*、*Intestinimonas* 和 *Dubosiella* 的相对丰度减少, 表明口服肝素能够影响小鼠肠道菌群结构。此外, 实验发现口服肝素对小鼠无明显毒副作用, 具有较高安全性。研究结果将为开发肝素口服递送策略提供新的思路, 为口服肝素类药物的开发提供参考。

关键词: 肝素, 口服, 肠道菌群, 降解, 胃肠道

Interaction between orally administrated heparin and intestinal microbiota in mice

Xue Zhou¹, Yi Wang², Dong He², Wen Zeng², Chong Zhang², Zhenglian Xue¹, and Xinhui Xing²

1 College of Biological and Chemical Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, Anhui, China

2 Key Laboratory of Industrial Biocatalysis of Ministry of Education, Institute of Biochemical Engineering, Department of Chemical Engineering; Center for Synthetic and Systems Biology, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract: The development of orally administrated heparin drugs requires a systematic understanding of the interaction

Received: April 19, 2019; **Accepted:** June 6, 2019

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 8161101047).

Corresponding authors: Zhenglian Xue. Tel/Fax: +86-533-2871254; E-mail: xuezl@ahpu.edu.cn

Xinhui Xing. Tel/Fax: +86-10-62772249; E-mail: xhxing@tsinghua.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 8161101047) 资助。

网络出版时间: 2019-07-19

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20190718.1550.001.html>

between heparin and gut flora. The *in vivo* distribution of fluorescein-labeled heparin that is orally administrated by mice was observed using fluorescein microscopy. In addition, the stability of heparin in simulated gastric and intestinal fluids, as well as the *in vitro* degradation of heparin by gut flora were detected by HPLC. The results show that orally administrated heparin was mainly distributed in the gastrointestinal tract of mice, and exerted structural stability under the condition of simulated gastric and intestinal fluids *in vitro*. However, heparin could be degraded by intestinal flora cultured in medium containing heparin. In order to further study the effect of orally administrated heparin on intestinal flora in mice, the fecal microbiota 16S rRNA fragment of C57BL/6J mice was tested by the Illumina Mi-Seq high-throughput sequencing technology. Compared with the gut flora of mice that orally administrated by saline, the biodiversity of gut flora in mice with orally administrated heparin was decreased. The difference of microflora structure was not significant at the phylum level, and the relative abundance of *Alistipes*, *Parasutterella* and *Akkermansia* was increased at the genus level, and the relative abundance of *Bilophila*, *Enterorhabdus*, *Ruminiclostridium*, *Prevotellaceae_UCG_001*, *Ruminiclostridium-9*, *Bacteroides*, *Lachnoclostridium*, *Candidatus*, *Saccharimonas*, *Intestinimonas* and *Dubosiella* was reduced. These findings indicate that heparin could influence the gut flora of mice. In addition, no obvious toxic and side effects were found in mice that orally administrated heparin, suggesting the safety of orally administrated heparin.

Keywords: heparin, oral administration, gut microbiota, degradation, gastrointestinal tract

肝素是一种天然存在于哺乳动物体内的线性多糖大分子,属于糖胺聚糖家族。其结构中含有3-O-硫酸基的特殊五糖结构,能特异性结合血液中的AT III,从而使肝素具有抗凝活性^[1-4]。肝素作为抗凝血药物应用于临床已有80多年的历史,目前低分子量肝素是临床上应用最广泛的抗凝血药物之一。在临床应用中,肝素类药物以静脉或皮下注射给药途径为主,尚未见口服肝素类药物上市。由于肝素口服制剂不仅能减少通过注射给药的疼痛和不适,而且还有可能减少住院时间,有更好的患者依从性,因此口服肝素类药物的开发具有重要的临床意义和应用价值。

通常认为肝素分子量大、带强负电、极性高等特性是导致肝素口服生物利用度低的主要原因^[5]。根据这些特性,以往的研究者已经尝试使用多种药物递送剂改善口服肝素经胃肠道吸收困难的问题,包括制备肝素缀合脱氧胆酸形成复合物^[6-7]、脂质体^[8]、油-水乳剂以及与聚合物和纳米颗粒结合等修饰方式研制肠溶肝素制剂等^[9-11]。但是有关口服肝素在体内的吸收代谢途径及其与肠道菌群的相互作用目前仍不明确。在大鼠静脉和动脉血栓形成模型中,肝素经口服给药后能在内皮细胞中发现肝素存在,并且检测到显著的抗

血栓活性^[12-13],表明口服肝素在体内能被内皮吸收发挥作用。关于口服肝素体内分布的研究中,通过口服给与小鼠荧光标记的牛磺胆酸(TCA)与肝素和多西紫杉醇(DTX)连接后的结合物,分析其在体内的分布发现该类肝素结合物能够达到小鼠结肠部位^[7]。通过口服给予大鼠0.025-15 mg/kg的亭扎肝素后,未能在给药后24 h内的粪便中检测出肝素^[14]。口服给予狗7.5 mg/kg的肝素胶囊24 h后,结果只在1只狗的粪便中检测到了肝素,而在实验组内的其他狗的粪便中均未检测到肝素^[15]。关于口服肝素后粪便中未检测到肝素,与胃肠道对口服肝素的消化降解作用以及粪便中肝素检测方法灵敏度相关。因此考察消化道对口服肝素的影响,需要了解口服肝素在胃液、小肠液和结肠液环境中的稳定性以及肠道菌群对肝素的降解能力。

解析口服肝素的体内活性以及生物利用度面临的另一个关键问题是阐明肝素与肠道菌群的相互作用。由于肝素糖链结构复杂以及高度硫酸化特性使其不易被降解,目前已知肝素酶可以通过识别特定底物裂解位点破坏糖苷键降解肝素^[16],定植于人体的多形拟杆菌 *Bacteroides thetaiotaomicron* 能够利用自身编码的糖苷水解酶

(GH)/多糖裂解酶 (PL) 和硫酸酯酶协同作用克服糖胺聚糖的硫酸化问题降解肝素^[17], 在厚壁菌门的大型基因组研究中发现存在一类可能有助于肝素代谢的 GH 或 PL 位点^[18]。通过分析肠道菌群降解肝素的能力, 考察肠道菌群对口服肝素稳定性和抗凝活性的影响, 为进一步解析口服肝素在消化道内的代谢和吸收提供基础。关于肝素对肠道菌群影响的研究中, Duan 等^[19]利用变性梯度凝胶电泳 (PCR-DGGE), 探索了口服肝素两周后的小鼠肠道菌群变化, 发现与口服生理盐水的小鼠相比, 口服肝素的小鼠粪便菌群中的乳杆菌变多而肠球菌减少, 暗示口服肝素会对肠道菌群结构产生影响。但是该研究仅采用 PCR-DGGE 进行了菌群解析, 能得到的信息有限, 无法全面揭示口服肝素对肠道菌群结构变化的影响。

综上所述, 虽然目前的研究初步揭示了口服肝素在有些条件下能够进入体内循环系统的现象, 但大部分研究尚处在探索阶段, 仅就口服肝素在体内不同脏器内的分布进行了探索, 而且不同研究采用的肝素形态和动物模型不同, 远远没有获得面向口服药物研制的统一结论, 对口服肝素在胃肠内的动态变化及其与肠道菌群的相互作用过程的系统研究还很初步。因此, 需要不断建立全面解析肝素在动物体内分布及其作用机制的方法。为了系统地揭示口服肝素在胃肠道的变化及其与肠道菌群的互动, 本研究采用健康小鼠作为动物模型, 通过检测荧光肝素在小鼠体内的分布和在模拟胃肠液中的稳定性, 建立体外检测肠道菌群对肝素降解作用的评价方法, 并结合 Illumina MiSeq 测序技术研究口服肝素对健康小鼠肠道菌群结构的影响。

本研究的意义在于通过分析口服肝素在健康模式动物胃肠道内的稳定性, 分析可能影响口服肝素发挥作用的因素, 为未来进一步研究口服肝素递送药物增加肝素在体内的吸收提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

肝素(河北常山生化药业股份有限公司, 原料药级, Mw: (16 430±40) Da, 抗 Xa 因子活性: (191.8±5.7) IU/mg)、厌氧肉汤培养基 (青岛海博生物科技有限公司)、氯化血红素(上海阿拉丁试剂有限公司)、维生素 K1 (上海阿拉丁试剂有限公司)、粪便基因组提取试剂盒 (DP328-02, 天根生化科技有限公司)、采用细菌基因组提取试剂盒 (DP302-02, 天根生化科技有限公司)、叠氮化钠 (色谱纯, Biotopped 公司)、无水硫酸钠(色谱纯, Sigma 公司)、TSK-GEL G2000SWXL (TOSOH 公司)、C57BL/6J 小鼠 (清华大学实验动物中心购买)。

1.2 方法

1.2.1 荧光肝素在体内代谢分布测定

荧光肝素制备: 将肝素溶液 (100 mg/mL)、Texas Red 酰肼 (Thermo Fisher Scientific 公司, 100 mg/mL 溶于 DMSO) 和 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (EDC, 20 mg/mL) 按 10:3:3 比例混合后, 室温避光孵育 2 h, 再添加少量 EDC (总浓度 1 mg/mL), 过夜孵育, 利用 3.5 kDa 透析袋彻底透析除盐并冻干后得到 Texas Red 标记的肝素。

C57BL/6J 雄性小鼠 (周龄: 6-8 周) 购自清华大学实验动物中心, 小鼠为无特定病原体 (SPF) 级, 在清华大学实验动物中心的屏障环境中饲养, 饲养环境为 12 h 光照/12 h 黑暗循环, 温度控制为 (22.5±2.5) °C, 湿度控制为 50%±5%。在 C57BL/6J 雄性小鼠禁食 24 h 后, 口服给与荧光肝素溶液 (25 mg/kg) 10 h 后, 眼眶取血并断颈处死小鼠后进行解剖, 采集小鼠的心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠和结肠组织样品, 在 4 °C PBS 缓冲液中短暂储存, 之后使用荧光体视镜观察上述组织中的荧光肝素分布情况, 实验中使用锡箔纸封好的离心管以避光保存小鼠器官。

1.2.2 肝素胃肠液稳定性测定

配制模拟胃液和模拟小肠液, 模拟胃液 (SGF): 胃蛋白酶 1.6 g, 氯化钠 2.0 g, HCl 调至 pH 1.2, 用容量瓶定容至 500 mL。模拟小肠液 (SIF): 肠液素 10.0 g, 磷酸二氢钾 6.8 g, NaOH 调 pH 至 6.8, 用容量瓶定容至 500 mL。模拟结肠液: 肠液素 10.0 g, 磷酸二氢钾 6.8 g, NaOH 调至 pH 7.2, 用容量瓶定容至 500 mL。按 30 mg/mL 的终浓度称取适量肝素粉末, 分别溶解于对应体积的模拟胃液、肠液和结肠液中, 分别移取各溶液 2 mL 至标记好的离心管中, 37 °C 孵育并在不同时间收获对应的离心管, 100 °C 下水浴 5 min 后, 10 000 r/min 离心 10 min 取 1.5 mL 上清液, 用 0.45 μm 滤头过滤, 将滤液冷冻干燥后测定肝素分子量变化。

1.2.3 肝素分子量测定

采用欧洲药典规定的凝胶渗透色谱法测肝素分子量。使用 WATERS 液相检测系统、紫外检测器和示差检测器串联、TSK-GELG2000SWXL (7.8 mm×300 mm, TOSOH, 日本) 进行检测。色谱条件如下, 流速: 0.5 mL/min, 柱温: 35 °C, 进样体积: 20 μL, 紫外检测波长: 234 nm, 时间: 40 min, 流动相: 28.4 g/L 无水硫酸钠溶液, pH 5.0±0.1。

1.2.4 粪便菌悬液制备

向 40 mL PBS 溶液中加入 20 mg 半胱氨酸盐充分溶解后 121 °C 灭菌 15 min, 配制成无菌预还原 PBS 溶液。在清华大学实验动物中心的超净工作台内取 5 粒新鲜小鼠粪便, 迅速放入含有 1 mL 无菌预还原 PBS 溶液的离心管中, 冰盒中带回实验室。用螺旋振荡器将粪便混匀制成菌悬液, 4 °C、1 000 r/min 瞬时离心 2 次, 取上清液作为接种菌悬液。

1.2.5 小鼠肠道菌群的体外培养

称取 60 g 厌氧肉汤培养基 (GAM) 溶于 1 000 mL 蒸馏水中使其充分溶解后, 按 60 mL/250 mL 分装于厌氧培养瓶中, 121 °C 灭菌 15 min,

按 0.05% 的终浓度分别加入过滤除菌后的维生素 K1 溶液与氯化血红素溶液配制成厌氧肉汤培养基。向其中再加入过滤除菌的肝素溶液配制成含有 0.5% 的肝素厌氧肉汤培养基。在超净工作台中向厌氧瓶培养瓶中通氮气以去除瓶中的氧气, 用无菌注射器按照 0.5% (体积比) 的接种量取接种菌悬液进行接种, 在恒温摇床中, 37 °C、200 r/min 下厌氧培养 48 h。

1.2.6 体外培养肠道菌基因组 DNA 提取

采用细菌基因组提取试剂盒提取肠道菌基因组, 严格按照试剂盒里的实验步骤逐步操作, 得到的核酸样品使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测提取的基因组 DNA 完整性。

1.2.7 PCR 扩增肠道菌群肝素酶基因

在 Brenda 酶库搜索肝素酶并获取基因序列, 根据基因序列信息设计了 7 对引物, 以体外培养的肠道菌基因组为模板, 以表 1 中的引物进行 PCR 反应, 通过琼脂糖电泳和 Gel Extraction kit (D2500-01, OMEGA BIO-TEK 公司) 纯化回收序列大小正确的扩增序列, 送至南京金唯智公司进行测序。

1.2.8 肝素抗凝活性测定

肝素的抗凝血活性通过使用 APTT 活化部分凝血酶时间测定试剂盒 (R3018, Sysmex 公司) 以及抗 Xa 活性测定试剂盒 (82098539, Chromogenix 公司, 发色底物法) 进行检测, 具体方法参考欧洲药典药品标准 EP7.0 及叶逢春博士论文方法^[20]。

1.2.9 肠道菌群体外共孵育肝素底物

配制肝素底物缓冲液 (100 mL): Tris 0.208 7 g、NaCl 0.257 4 g、无水氯化钙 0.007 77 g, 肝素 1.0 g, HCl 调至 pH 7.0±0.1。

将厌氧培养 48 h 后的 20 mL 菌液移入离心管中, 4 °C、10 000 r/min 离心 15 min 取沉淀, 再用 PBS 缓冲液清洗菌体 2 次, 将得到的菌体与肝素底物缓冲液在 30 °C 下共孵育 3 h, 孵育完毕后 13 000 r/min 离心 20 min, 取上清低温冷冻干燥

后,用高效液相色谱仪检测肝素分子量变化。

1.2.10 动物实验设计及粪便取样

将 C57BL/6J 雄性小鼠 (周龄: 6-8 周) 随机分成两组即灌胃生理盐水组 (WT 组) 和灌胃肝素组 (HP 组), 每组 10 只。按 30 mg/(kg·d) 的肝素剂量连续给小鼠灌胃 30 d, 对照组小鼠灌胃生理盐水, 实验过程中所有小鼠均可任意饮水与进食。给药期间记录小鼠体重变化, 在动物实验中心的超净工作台内采集每只小鼠灌胃后的第 10、20、30 天的新鲜粪便样本, 每次采集粪便后迅速置入标记过的 1.5 mL 无菌离心管内置于冰盒中, 在实验室-80 °C 冰箱中储存直至分析。

1.2.11 粪便样本基因组 DNA 提取

使用粪便基因组提取试剂盒提取粪便菌群基因组, 严格按照试剂盒里的实验步骤逐步操作, 得到的核酸样品使用超微量分光光度计测定含量, 并用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测提取的基因组 DNA 完整性。

1.2.12 16S rRNA 微生物群落分析

通过测定 16S rRNA 中的 V3-V4 区序列, 对小鼠的肠道菌群结构进行分析。高通量测序文库构建和基于 Illumina MiSeq 平台的测序工作由 GENEWIZ 公司 (苏州, 中国) 完成。经过质量过滤, 去除嵌合体序列, 最终得到的序列用于操作分类单元 (Operational taxonomic unit, OTU) 分析, 使用 VSEARCH (1.9.6) 进行序列聚类 (序列相似性设为 97%), 用参考数据库 Silva 132 比对 16S rRNA。然后用 RDP classifier (Ribosomal Database Program) 贝叶斯算法对 OTU 的代表性序列进行物种分类学分析, 之后分析样本的 Alpha 多样性和 Beta 多样性, 统计每个样本的群落组成。

1.2.13 结肠长度、脾重指数与组织学分析

给药周期结束后, 给予小鼠安乐死, 并解剖小鼠获得全段结肠组织, 用标尺测量小鼠结肠长度后, 取一部分结肠组织置于 10% 福尔马林中固定, 之后制作肠组织石蜡切片, 再对切片进行苏

表 1 肝素酶引物序列

Table 1 Primer sequence of heparinase

Primer name	Primer sequence(5'-3')	Size (bp)
A-F	AGAAAAGCATCCTGCGTCTGAGTC	24
A-R	CTTGATCTGTGATGATAGTCGCACCT	26
B-F	ACGGGTAAACGTACAGGCTG	20
B-R	ACGGGAACGGTACTATCACCTAC	23
C-F	GACCGAACGGGTGAATGTT	19
C-R	ACCTATAGCATAACGGCACTGT	22
D-F	GCATTAATCACCCCTCTGCCT	20
D-R	AGAGCCCCCTATTTCTCTGAGT	22
E-F	AAGCAGGCCAGAGGTTACCT	20
E-R	GCTATCTGTACGCTACCACTTTC	24
F-F	CTGGCAAGAGATAGAGGGAGTTAAT	25
F-R	TGGCAAAGTAACGACACGAT	21
G-F	GAGCAACCTGCCGTGATAAAGGT	23
G-R	GGTTTCGGTAAGGAATCAACCAGTCT	26

木精-伊红染色, 通过显微镜观察拍照。另取小鼠脾脏, 在分析天平上测定湿重并记录, 计算出脾重指数, 即脾重指数=脾脏重量(mg)/体重(g)。结果以 mg/10 g 体重表示。

1.2.14 统计学分析

所有实验均有生物学重复, 所有数据均以平均值±标准偏差表示。生物统计学显著性差异使用 Origin Lab 软件 (Origin Pro 8.0, Origin Lab Co, Northampton, MA, USA) 进行单向方差分析 (ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 口服荧光肝素的小鼠体内分布

使用荧光体式镜分别观察口服灌胃荧光肝素 10 h 后, 小鼠的心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠和结肠的荧光肝素分布情况。如图 1 所示, 荧光肝素主要分布在小鼠的胃、小肠的食糜中以及结肠部位 (图 1A); 而在小鼠的心、肝、脾、肺、肾的剖面并未观察到荧光肝素的分布 (图 1B), 同时血清中也未检测到荧光肝素信号。表明口服肝素 10 h 后肝素主要集中在胃肠道中, 未经血液循环进入到肠外其他脏器中。由此可以推测, 小鼠口服肝素后, 胃肠道环境是影响口服肝素代

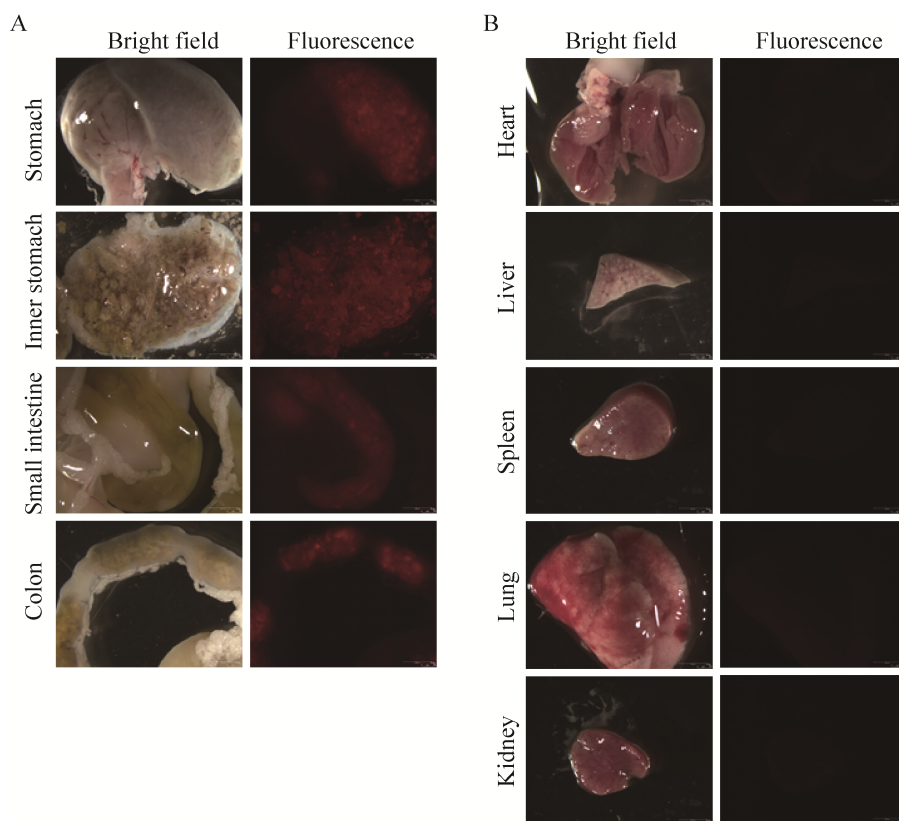


图 1 荧光肝素在小鼠体内不同组织中的分布

Fig. 1 Distribution of fluorescent heparin in tissues. (A) From the top to the bottom are the stomach, stomach section, small intestine and colon tissue. (B) From top to bottom are the heart, liver, spleen, lung and kidney tissue sections. The left side of the figure is the famous field, and the right side is the corresponding fluorescent picture.

谢与稳定性的主要因素之一，因此需要了解口服肝素在胃肠道环境中的存在特性。

2.2 肝素在模拟胃肠液中的稳定性

实验使用的肝素为未分级肝素，是一种分子量不均一的混合物，色谱峰分布较宽，保留时间为 13.8 min (图 2A)。通过灌胃给药肝素后肝素首先进入胃环境，其主要特点是酸性较强。结果发现在模拟胃液中消化 12 h 的肝素色谱峰的保留时间和峰面积均未变化 (图 2B)，说明肝素在模拟胃液环境中比较稳定，肝素分子量无明显变化。此外，在模拟小肠液条件下消化 12 h 的肝素色谱峰的保留时间和峰面积也没有变化 (图 2C)，表明肝素在模拟小肠液条件下稳定性较好。最后，肝素在模拟结肠液条件下消化 24 h 内的色谱峰的保留

时间和峰面积没有改变 (图 2D)，表明肝素在模拟结肠液环境中稳定性高。以上实验结果表明，模拟胃液、小肠液和结肠液对肝素的稳定性影响较小，暗示口服肝素能够稳定到达结肠部位。

2.3 肠道菌群体外降解肝素的特性

考虑到上述模拟胃肠液为无菌状态，而现实小鼠肠道特别是结肠段存在大量肠道菌群，因此探究口服肝素在小鼠肠道内的代谢，需要考察肝素与肠道菌群的互作关系。由于肠道内环境十分复杂，结肠内存在种类繁多且宿主难以消化的复杂多糖，会对低剂量肝素检测产生较大的影响，且目前尚未建立检测肠道内和粪便中肝素的有效分析方法。因此，我们通过体外培养粪便菌群的方法，间接推测结肠中肠道菌群对肝素的影响。

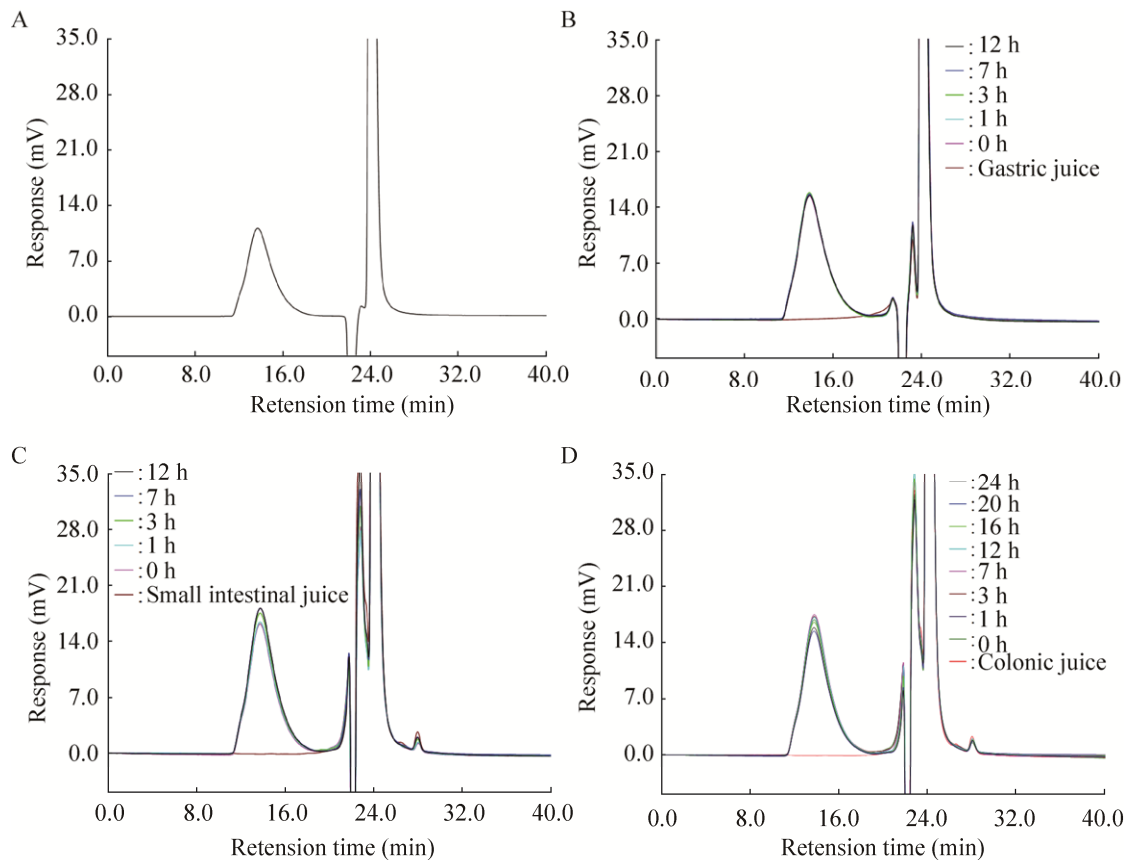


图 2 肝素在模拟胃肠液中的高效液相色谱图

Fig. 2 High performance liquid chromatogram of heparin in simulated gastrointestinal fluids for different time periods. (A) Standard heparin. (B) Heparin in simulates gastric fluid. (C) Heparin in simulates small intestine fluid. (D) Heparin in simulates colon fluid.

在体外使用添加肝素的厌氧肉汤培养基培养粪便菌群，收集并测定培养 0、2、6、24 h 时培养液中的肝素，发现培养液中的肝素色谱峰保留时间一致。但是在同样的样品制备条件下，随着培养时间延长不同培养液中的肝素峰面积逐渐减小(图 3A)，表明肝素能被厌氧瓶中培养的肠道菌群降解。与添加肝素的厌氧肉汤培养基培养的肠道菌群细胞体外共孵育后的肝素色谱图明显右移，保留时间增大，肝素分子量变小，出现与低分子肝素色谱图相似的寡糖色谱峰(图 3B)，进一步表明体外培养的肠道菌群可以利用肝素且能将大分子肝素降解为小分子肝素。由此推测，体外培养的小鼠肠道菌群中存在能够降解肝素的菌属，

暗示肠道菌群会对口服肝素产生影响。

为了进一步获得培养菌群降解肝素的分子证据，进一步提取体外培养的肠道菌群基因组(图 4A)，利用肝素酶引物对该基因组进行 PCR 扩增，通过琼脂糖凝胶电泳检测得到扩增后的 DNA 电泳条带(图 4B)。并对 DNA 进行回收、纯化与测序后，在 NCBI 中进行序列比对，其中 A 引物扩增得到的序列与多形拟杆菌 *Bacteroides thetaiotaomicron* 7330 编码的肝素酶 II (*hep B*) 相似度达 99% (Sequence ID: CP012937.1)，G 引物扩增得到的序列与解纤维素拟杆菌 *Bacteroides cellulosilyticus* WH2 编码的肝素酶 II (*hep B*) 相似度达 97% (Sequence ID: CP012801.1)。肝素酶 II 是以肝素和

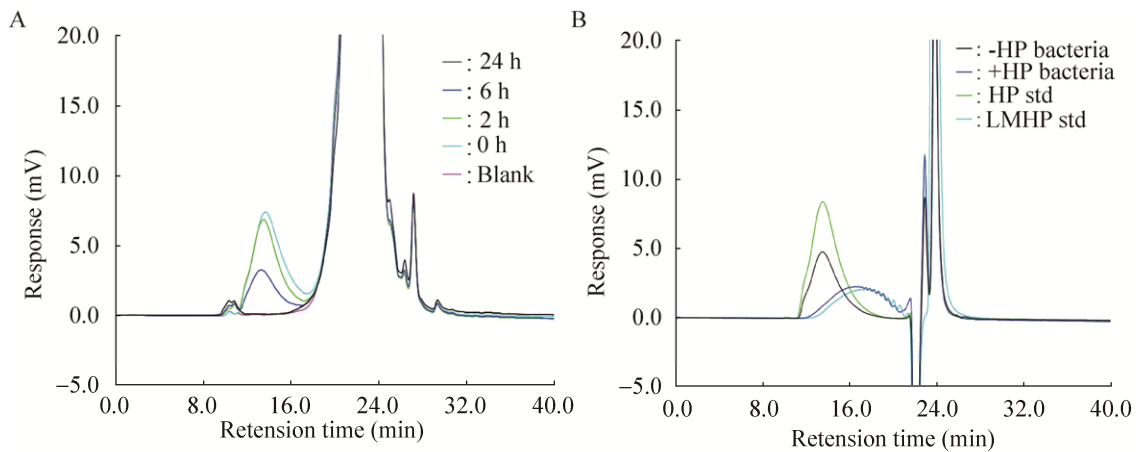


图3 肝素体外降解色谱图

Fig. 3 Chromatogram of degradation heparin *in vitro*. (A) High-performance gel permeation chromatogram of heparin after fermented *in vitro* at different time points. Blank: Anaerobic broth medium. (B) Chromatogram of *in vitro* degradation of heparin substrate after culture of intestinal flora with (+HP bacteria) or without (-HP bacteria) heparin medium.

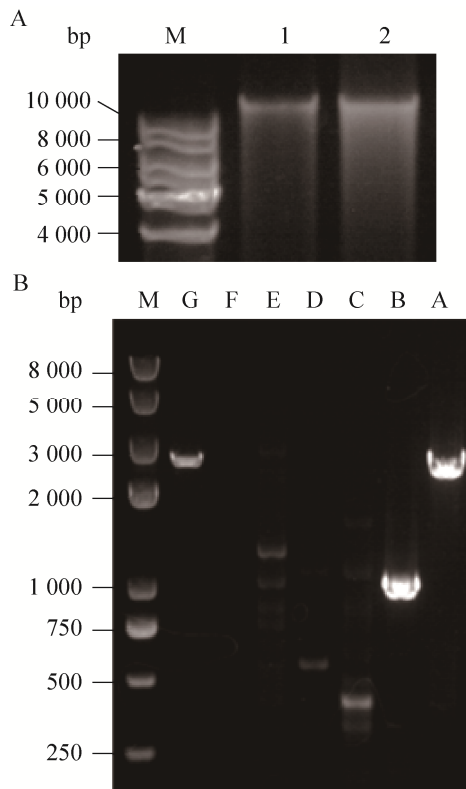


图4 细菌基因组及PCR产物电泳图

Fig. 4 Electrophoresis of bacterial genome and PCR products. (A) Agarose gel electro-phoresis of bacterial genome. M: DNA marker; band 1 and 2: bacterial genome of two samples. (B) Agarose gel electrophoresis of PCR amplified. M: DNA marker; A–G: PCR amplification products by primer A–G (Table 1), respectively.

硫酸乙酰肝素为底物，裂解 2-O 硫酸化的糖醛酸的典型肝素酶。上述结果进一步证明体外培养的肠道菌群中可能存在产生肝素酶 II 的菌群，从而发挥了降解肝素的作用。此外，为研究肠道菌群降解后的肝素抗凝活性变化，检测了被体外培养的肠道菌群降解后肝素的活化部分凝血活酶时间 (APTT) 和抗 Xa 因子活性。结果发现，与原肝素相比，其抗凝活性没有明显下降趋势仍具有抗凝活性 (表 2)，说明培养肠道菌群降解后的肝素仍有抗凝活性，该结果为口服抗凝肝素研制提供了参考。

2.4 口服肝素对健康小鼠肠道菌群的影响

2.4.1 口服肝素对健康小鼠肠道菌群的总体结构影响

本文通过测定粪便菌群的 16S rRNA 的 V3–V4 区，分析第 10、20、30 天的 HP 组与 WT 组

表 2 经体外培养肠道菌群降解后肝素抗凝活性

Table 2 The anticoagulant activity of heparin after *in vitro* degradation by cultivated intestinal flora

Sample	APTT (IU/mg)	FL (%)	Anti Xa (IU/mg)	FL (%)
HP	163.93	6.1	216.25	10.9
Degraded HP	158.69	10.4	184.64	9.4

FL: fiducial limit.

小鼠的粪便菌群差异。在移除不合格序列后，每个样品平均获得约 70 000–90 000 万条序列信息。根据 97% 的序列相似性分析，在不同时间点的 WT 组和 HP 组中都鉴定出 435 个以上的 OTUs，测序数据量相同时，在灌胃第 10、20、30 天时 HP 组 OTUs 数目均高于 WT 组 (表 3)。对于不同组中的所有样品序列，Goods_coverage 较高几乎完全覆盖 (表 3)，表明该测序方法可以表征肠道菌群的真实组成。分析 Alpha 多样性发现，在灌胃第 10、20、30 天时 HP 组与 WT 组相比差异不显著，但在灌胃第 10 天时与 WT 组相比 HP 组中 Shannon 和 Simpson 值显著下降 ($P < 0.05$)。以上结果表明，

灌胃肝素对健康小鼠的肠道菌群结构有影响。

为了进一步验证上述结果，应用了 Venn 图解分析，主坐标分析 (PCoA) 和聚类分析 (图 5)。如图 5A 所示，大部分 OTUs 是 WT 组和 HP 组共有的，少数是各自独特的 OTUs，其中灌胃 30 d 后的小鼠特有的 OTUs 数最多。PCoA 评分图揭示了 HP 组小鼠的肠道菌群与 WT 组相比存在差异，但相同处理不同天数的小鼠的微生物群差异较小 (图 5B)。聚类分析也表明 WT 组和 HP 组微生物群之间存在差异性 (图 5C)。这些结果进一步证实了灌胃肝素能在一定程度上调节健康 C57BL/6J 小鼠的肠道菌群结构。

表 3 不同灌胃时间的 HP 组及 WT 组小鼠肠道菌群多样性指数

Table 3 Diversity of gut microbiota of HP and WT groups after different time of oral administration

Group	Richness		Diversity		Goods_coverage	Reads	OTUs
	Ace	Chao1	Shannon	Simpson			
10d WT	465±15	478±30	6.71±0.11	0.981±0.002	0.999±0.000	59781±10437	431±14
10d HP	471±8	481±5	6.42±0.10*	0.970±0.004*	0.999±0.000	63457±3306	443±7
20d WT	473±13	479±17	6.52±0.17	0.979±0.003	0.999±0.000	62239±12331	442±11
20d HP	474±7	479±4	6.50±0.06	0.973±0.001	0.999±0.000	63837±1666	449±4
30d WT	463±8	476±13	6.39±0.19	0.976±0.003	0.999±0.000	59555±3583	429±15
30d HP	469±4	470±7	6.00±0.49	0.956±0.016	0.999±0.000	54940±5534	433±15

WT: control; HP: heparin; data are expressed as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$), * $P < 0.05$.

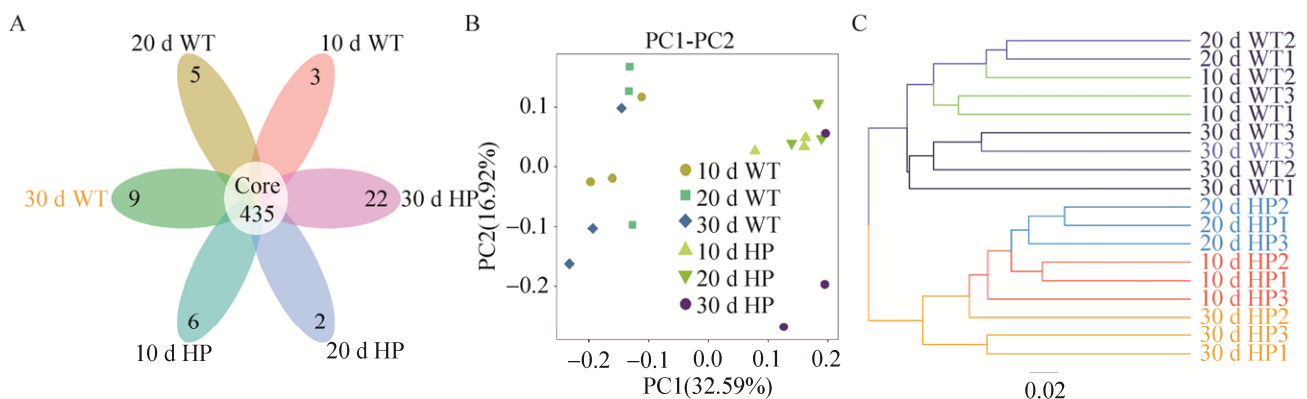


图 5 灌胃肝素对小鼠肠道菌群结构影响

Fig. 5 Structural modulation of gut microbiota by heparin treatments. (A) Venn diagrams showing the unique and shared OTUs in the gut microbiota among the WT group and heparin group in different time points of oral administration. (B) Plots shown were generated using the unweighted version of the UniFrac-based PcoA. (C) Clustering analysis of variance from PCoA matrix scores; WT: control group; HP: heparin group.

2.4.2 灌胃肝素对小鼠肠道菌群中特定菌属的影响

为了分析 HP 灌胃后的小鼠肠道菌群结构变化, 在门和属水平上比较了灌胃不同时间 HP 组和 WT 组小鼠的菌群结构差异。如图 6A 所示, 在门水平上, WT 组和 HP 组小鼠肠道菌群中优势菌门组成无差异, 主要由厚壁菌门、拟杆菌门、

变形菌门、脱铁杆菌门和放线菌门等菌门构成。在第 30 天时 HP 组和 WT 组中拟杆菌门相对丰度均有增高趋势, 但是差异不显著。在门水平上, 相同时间点 HP 组与 WT 组间菌群没有显著差异, 通过对 3 个时间点的 WT 组和 HP 组内样品进行 LEfSe 分析, 在属水平上发现了两组中分别对肠

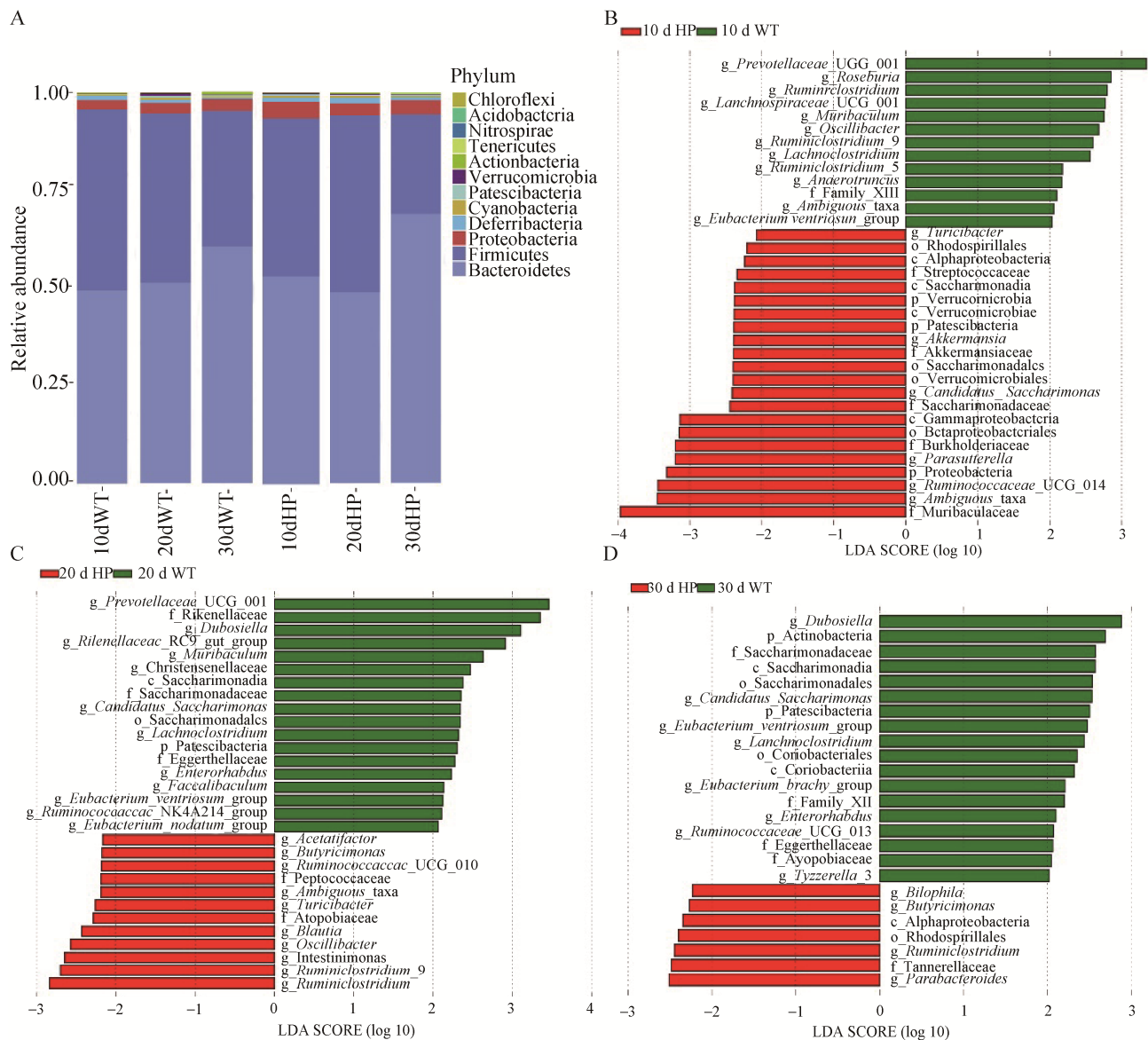


图 6 灌胃肝素在门和属水平对肠道菌群的影响

Fig. 6 Response of gut microbiota at the phylum and genus levels to heparin treatments. (A) Relative abundance of gut microbiota at the phylum level. LEfSe analysis identifies the gut microbiota phylotypes with the statistical difference in abundance between the WT and HP groups. (B) After 10 d. (C) After 20 d. (D) After 30 d. Only the phylotypes with LDA score higher than 2 were shown.

道菌群结构差异性影响较大的微生物。图 6B、6C 和 6D 中显示了灌胃后第 10、20、30 天时 WT 组和 HP 组内的样本基于 LDA 分值分析得到的柱状图，柱状图中展示了两个组别中分别对菌群结构差异贡献较大的标志性微生物。由图 6B 所示，在灌胃第 10 天时 WT 组与 HP 组肠道菌群存在一定差异，HP 组中对菌群结构差异影响较大的微生物主要是来自变形菌门 *Proteobacteria* 中的 *Parasutterella*、疣微菌门 *Verrucomicrobia* 中的 *Akkermansia* 和 *Ruminococcaceae-UCG-014* 等，WT 组中对菌群结构差异影响较大的微生物是 *Prevotellaceae_UCG_001*、罗斯氏菌属 *Roseburia*、*Ruminiclostridium*、颤杆菌属 *Oscillibacter*、厌氧棍状菌属 *Anaerotruncus* 和 *Lachnoclostridium*；由图 6C 所示，在灌胃 20 d 时 HP 组中对菌群结构差异影响较大的优势菌为丁酸弧菌属 *Butyricimonas*、

Ruminiclostridium、*Ruminiclostridium_9*、*Oscillibacter* 和 *Intestinimonas*，而 WT 组中的优势菌为 *Prevotellaceae_UCG_001*、*Lachnoclostridium* 以及 *Enterorhabdus*；在灌胃 30 d 时发现 (图 6D)，在 HP 组对菌群结构差异影响较大的 *Butyricimonas* 和 *Parabacterioides* 等丰度升高，而 *Dubosiella*、*Lachnoclostridium* 和 *Candidatus_Saccharimonas* 等丰度降低。说明口服肝素能够改变小鼠肠道中某些菌属的相对丰度，对健康 C57BL/6J 小鼠肠道菌群结构有调节作用。

2.5 口服肝素的体内药物安全性

分别检测连续灌胃 30 d 肝素和灌胃生理盐水后健康小鼠的体重、结肠长度、脾重指数和结肠组织结构变化，初步分析口服肝素的生物安全性。如图 7A 所示，HP 组与 WT 组的小鼠体重变化趋势一致。通过测定 WT 组和 HP 组小鼠的结肠长

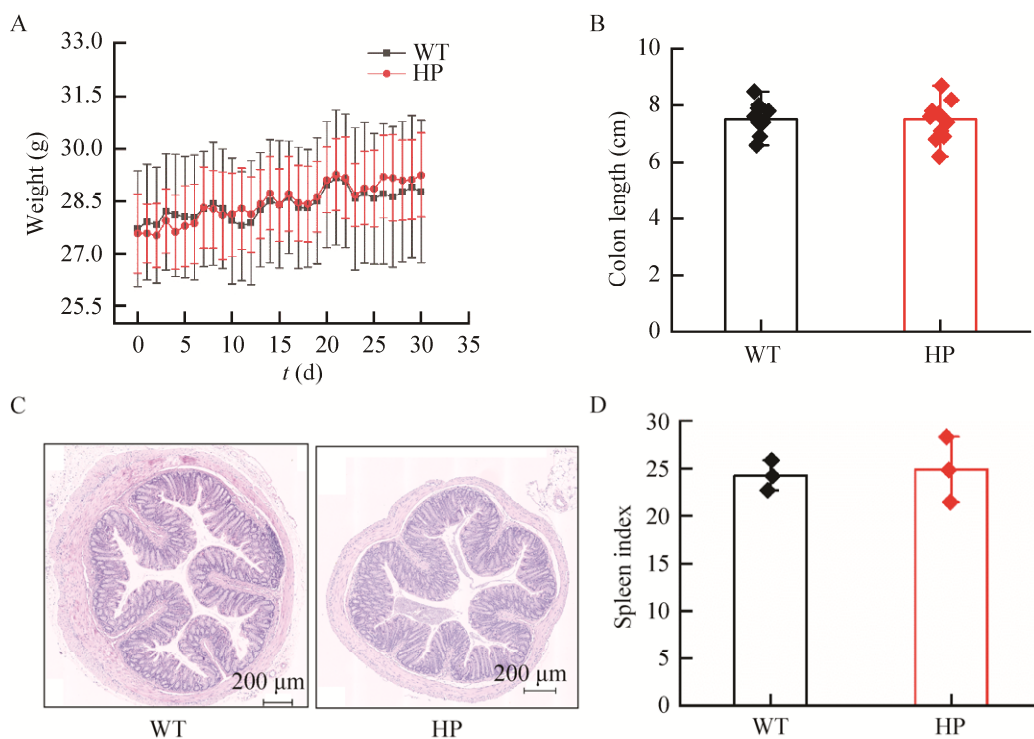


图 7 口服肝素对小鼠生长的影响

Fig. 7 Effect of oral heparin on mouse growth. (A) The curve of body weight change in mice with heparin administered for 30 d. (B) Effect of gavage heparin 30 d on colon length in mice. (C) HE-stained of colon section of mice after heparin administration for 30 d. (D) Effects of gavage heparin 30 d on spleen weight index in mice.

度以及观察结肠组织结构 HE 染色切片, 分析口服肝素对小鼠结肠的宏观结构影响。发现 WT 组与 HP 组小鼠的结肠长度无统计学差异 (图 7B)。HP 组与 WT 组小鼠的结肠结构相似, 肠粘膜完整无脱落, 隐窝结构正常, 上皮细胞排列整齐, 形态正常 (图 7C), 提示长期口服肝素对小鼠的结肠长度、结构无显著影响。脾重指数是粗略反映机体免疫能力强弱的指标, 如图 7D 所示, 灌胃肝素 30 d 后 HP 组与 WT 组的脾重指数也无生物学差异, 说明口服灌胃肝素 30 d 对小鼠的免疫功能无明显影响。以上结果均表明口服肝素对健康小鼠具有较高安全性。

3 讨论

本研究首先通过体外菌群培养和动物实验, 结合高效液相色谱法等现代仪器分析手段以及 Illumina 高通量测序技术, 对肝素和肠道菌群的相互作用过程进行分析, 初步探究了肠道菌群对肝素的降解作用和口服肝素对小鼠肠道菌群的调节作用。体外实验结果表明, 肝素在模拟胃肠液中的稳定性高, 不易被降解。之前的研究也表明肝素中糖苷键不易被酸水解, 其中的 O-硫酸基对酸水解相当稳定, 而在碱性条件下, N-硫酸基相当稳定^[21-22]。实验证明肝素能够被体外培养的肠道菌群降解, 目前相关代谢组学研究也发现粪便菌群能够编码丰富多样的复杂多糖降解酶, 特别是拟杆菌门中的菌属^[23]。通过检测体外培养的肠道菌群降解后的肝素的抗凝血活性, 发现降解前后肝素抗凝活性变化较小, 这与前人研究报道提及的经肝素酶 II 和 III 降解的肝素仍有抗凝活性的结果一致^[24]。这一结果表明, 尽管肠道菌群能够降解口服肝素, 但其抗凝活性仍能够保持, 为未来口服肝素药物递送策略的研究提供了参考。

体内动物实验表明口服荧光标记的肝素主要分布在小鼠胃肠道内, 这与之前一项口服荧光肝

素复合物在体内代谢研究结果一致, 荧光肝素主要在回肠积累, 在结肠中也有分布^[7]。分析粪便菌群的 16S rRNA 序列发现, 长期口服肝素的小鼠肠道菌群结构发生变化, 与 WT 组相比灌胃肝素后小鼠的肠道菌群多样性降低; 在属水平上, 口服肝素使肠道菌群中的某些菌属, 如 *Parasutterella*、*Akkermansia*、*Ruminiclostridium*、*Intestinimonas*、*Butyricimona* 和 *Parabacterioides* 的相对丰度增加。现在已经发现 *Parasutterella* 菌属能够产生琥珀酸, 细菌来源的琥珀酸盐通过促进严格厌氧细菌的定殖, 对宿主产生有益作用^[25]; 其中的 *Intestinimonas* 和 *Butyricimonas* 菌属中的某些菌属被发现能够产生短链脂肪酸^[26-28]; 而 *Akkermansia* 菌属中的 *Akkermansia muciniphila* 被认为是一种很有前景的益生菌, 能够降解肠粘蛋白生成短链脂肪酸^[29], 与肥胖、糖尿病、心脏代谢疾病和低度炎症呈负相关^[30-31], 另外还有研究发现它能粘附于肠上皮细胞并在体外增强肠上皮单层细胞完整性, 增强受损肠道的屏障功能^[32]。口服肝素后 *Bilophila*、*Enterorhabdus* 菌属的相对丰度减少。其中 *Enterorhabdus* 被发现在前驱糖尿病患者体内丰度增高^[33]; *Bilophila* 菌属中的沃氏嗜胆菌 *Bilophila wadsworthia* 是一种能够引起和加重炎症的致病菌^[34-35]。

最后, 在口服肝素生物安全性方面, 本研究表明长时间口服肝素没有对小鼠的生长产生明显负面影响, 表明口服肝素安全性高。这与 Kim 等^[36]用低分子量肝素-脱氧胆酸盐结合物对小鼠口服毒性研究结果一致, 该研究中没有造成小鼠的体征参数以及死亡率的变化, 通过延长给药时间至 4 周小鼠也无死亡和体重下降现象。综上所述, 口服灌胃肝素能够被肠道菌群降解, 能够在一定程度上调节肠道菌群结构, 这可能与口服肝素的生物利用度和体内生物活性的发挥有关, 为未来口服肝素类药物的开发及药效解析提供参考。

REFERENCES

- [1] Torri G, Naggi A. Heparin centenary – an ever-young life-saving drug. *Int J Cardiol*, 2016, 212(S1): S1–S4.
- [2] Damus PS, Hicks M, Rosenberg RD. Anticoagulant action of heparin. *Nature*, 1973, 246(5432): 355–357.
- [3] Rosenberg RD, Lam L. Correlation between structure and function of heparin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76(3): 1218–1222.
- [4] Lever R, Page CP. Novel drug development opportunities for heparin. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1(2): 140–148.
- [5] Money SR, York JW. Development of oral heparin therapy for prophylaxis and treatment of deep venous thrombosis. *Cardiovasc Surg*, 2001, 9(3): 211–218.
- [6] Kim SK, Vaishali B, Lee E, et al. Oral delivery of chemical conjugates of heparin and deoxycholic acid in aqueous formulation. *Thromb Res*, 2006, 117(4): 419–427.
- [7] Khatun Z, Nurunnabi M, Cho KJ, et al. Oral absorption mechanism and anti-angiogenesis effect of taurocholic acid-linked heparin-docetaxel conjugates. *J Control Release*, 2014, 177: 64–73.
- [8] Lavanya N, Muzib YI, Aukunuru J, et al. Preparation and evaluation of a novel oral delivery system for low molecular weight heparin. *Int J Pharm Investig*, 2016, 6(3): 148–157.
- [9] Paliwal R, Paliwal SR, Agrawal GP, et al. Recent advances in search of oral heparin therapeutics. *Med Res Rev*, 2012, 32(2): 388–409.
- [10] Hiebert LM. Oral heparins. *Clin Lab*, 2002, 48(3/4): 111–116.
- [11] Zhu M, Li LA, Wang GB. Recent progress in research of oral low molecular weight heparin. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2010, 27(2): 105–108 (in Chinese). 诸敏, 李立安, 王根宝. 低分子肝素口服制剂的国内外研究进展. *中国现代应用药学*, 2010, 27(2): 105–108.
- [12] Hiebert LM, Ping T, Wice SM. Repeated doses of oral and subcutaneous heparins have similar antithrombotic effects in a rat carotid arterial model of thrombosis. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2012, 17(1): 110–116.
- [13] Hiebert LM, Ping T, Wice SM. Enhanced antithrombotic effects of unfractionated heparin in rats after repeated oral doses and its relationship to endothelial heparin concentration. *Br J Pharmacol*, 2010, 153(6): 1177–1184.
- [14] Hiebert LM, Wice SM, Ping T. Tissue distribution of the low molecular weight heparin, tinzaparin, following administration to rats by the oral route. *Biomed Pharmacother*, 2004, 58(6/7): 372–380.
- [15] Erickson M, Hiebert LM, Carr AP, et al. Effect of oral administration of unfractionated heparin (UFH) on coagulation parameters in plasma and levels of urine and fecal heparin in dogs. *Can J Vet Res*, 2014, 78(3): 193–201.
- [16] Desai UR, Wang HM, Linhardt RJ. Specificity studies on the heparin lyases from *Flavobacterium heparinum*. *Biochemistry*, 1993, 32(32): 8140–8145.
- [17] Cartmell A, Lowe EC, Baslé A, et al. How members of the human gut microbiota overcome the sulfation problem posed by glycosaminoglycans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(27): 7037–7042.
- [18] Sheridan PO, Martin JC, Lawley TD, et al. Polysaccharide utilization loci and nutritional specialization in a dominant group of butyrate-producing human colonic *Firmicutes*. *Microb Genom*, 2016, 2(2): e000043.
- [19] Duan RS, Chen XE, Wang FS, et al. Oral administration of heparin or heparosan increases the *Lactobacillus* population in gut microbiota of rats. *Carbohydr Polym*, 2013, 94(1): 100–105.
- [20] Ye FC. Design of multifunctional fusion heparinase and its application in the production of low molecular weight Heparin[D]. Beijing: Tsinghua University, 2010 (in Chinese). 叶逢春. 多功能融合肝素酶的设计及其制备低分子量肝素工艺[D]. 北京: 清华大学, 2010.

- [21] 张天民, 吴梧桐, 王发同. 动物生化制药学. 北京: 人民卫生出版社, 1981: 224–225.
- [22] 左耀明, 刘智. 肝素的理化特性与药理作用. 中国生化药物杂志, 1990(3): 44–47.
- [23] Koropatkin NM, Cameron EA, Martens EC. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol*, 2012, 10(5): 323–335.
- [24] Ji Y. Production of heparin derivatives using heparinases and their therapeutic effects on ulcerative colitis [D]. Beijing: Tsinghua University, 2018 (in Chinese). 季洋. 酶解去抗凝肝素衍生物的制备及其治疗结肠炎的功效研究[D]. 北京: 清华大学, 2018.
- [25] Ju TT, Kong JY, Stothard P, et al. Defining the role of *Parasutterella*, a previously uncharacterized member of the core gut microbiota. *ISME J*, 2019, 13(6): 1520–1534.
- [26] Bui TPN, Ritari J, Boeren S, et al. Production of butyrate from lysine and the Amadori product fructoselysine by a human gut commensal. *Nat Commun*, 2015, 6(1): 10062.
- [27] Engels C, Ruscheweyh HJ, Beerenwinkel N, et al. The common gut microbe *Eubacterium hallii* also contributes to intestinal propionate formation. *Front Microbiol*, 2016, 7: 713.
- [28] Bui TPN, Shetty SA, Lagkouvardos I, et al. Comparative genomics and physiology of the butyrate-producing bacterium *Intestinimonas butyriciproducens*. *Environ Microbiol Rep*, 2016, 8(6): 1024–1037.
- [29] de Vos WM. Microbe profile: *Akkermansia muciniphila*: a conserved intestinal symbiont that acts as the gatekeeper of our mucosa. *Microbiology*, 2017, 163(5): 646–648.
- [30] Cani PD, de Vos WM. Next-generation beneficial microbes: the case of *Akkermansia muciniphila*. *Front Microbiol*, 2017, 8: 1765.
- [31] Schneeberger M, Everard A, Gómez-Valadés AG, et al. *Akkermansia muciniphila* inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice. *Sci Rep*, 2015, 5: 16643.
- [32] Reunanen J, Kainulainen V, Huuskonen L, et al. *Akkermansia muciniphila* adheres to enterocytes and strengthens the integrity of the epithelial cell layer. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(11): 3655–3662.
- [33] Yang JP, Summanen PH, Henning SM, et al. Xylooligosaccharide supplementation alters gut bacteria in both healthy and prediabetic adults: a pilot study. *Front Physiol*, 2015, 6: 216.
- [34] Zhou F, Long WM, Hao BH, et al. A human stool-derived *Bilophila wadsworthia* strain caused systemic inflammation in specific-pathogen-free mice. *Gut Pathog*, 2017, 9: 59.
- [35] Schneeberger M, Everard A, Gómez-Valadés AG, et al. *Akkermansia muciniphila* inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice. *Sci Rep*, 2015, 5: 16643.
- [36] Kim JY, Jeon OC, Moon HT, et al. Preclinical safety evaluation of low molecular weight heparin-deoxycholate conjugates as an oral anticoagulant. *J Appl Toxicol*, 2016, 36(1): 76–93.

(本文责编 郝丽芳)