

# 低聚果糖和低聚异麦芽糖促进斑马鱼 肠道蠕动作用的研究

侯海荣<sup>1,2</sup>, 张姗姗<sup>1,2</sup>, 孙晨<sup>1,2</sup>, 陈玉峰<sup>3</sup>, 何秋霞<sup>1,2</sup>, 李晓彬<sup>1,2</sup>, 于涛<sup>3</sup>,  
彭德杰<sup>3</sup>, 韩利文<sup>1,2\*</sup>, 刘可春<sup>1,2\*</sup>

(1.山东省科学院生物研究所,山东省科学院药物筛选技术重点实验室,山东 济南 250014;  
2.山东省科学院生物研究所,山东省科学院生物检测技术工程实验室,山东 济南 250014;  
3.蓬莱海洋(山东)股份有限公司,山东 蓬莱 265600)

**摘要:**探讨基于斑马鱼模型的低聚果糖及低聚异麦芽糖对肠道蠕动的促进作用。选用发育正常的5 d的斑马鱼幼鱼,各实验组分别加入不同浓度的低聚果糖和低聚异麦芽糖溶液,培养24 h后,在显微镜下观察其对斑马鱼肠道蠕动次数的影响。实验结果表明,125~500 mg/mL的低聚果糖和低聚异麦芽糖均对斑马鱼肠道蠕动有促进作用,蠕动次数与浓度成正相关性。相同浓度条件下,低聚果糖较低聚异麦芽糖促进斑马鱼肠道蠕动的的作用更明显。采用斑马鱼动物模型可实现促进肠蠕动药物的早期、快速筛选。

**关键词:**斑马鱼;低聚果糖;低聚异麦芽糖;肠道蠕动次数

中图分类号:R965.1 文献标识码:A 文章编号:1002-4026(2016)06-056-06

## The effect of fructo oligosaccharides and isomaltooligosaccharide on the intestinal peristalsis of zebrafish

HOU Hai-rong<sup>1,2</sup>, ZHANG Shan-shan<sup>1,2</sup>, SUN Chen<sup>1,2</sup>, CHEN Yu-feng<sup>3</sup>, HE Qiu-xia<sup>1,2</sup>,  
LI Xiao-bin<sup>1,2</sup>, YU Tao<sup>3</sup>, PENG De-jie<sup>3</sup>, HAN Li-wen<sup>1,2\*</sup>, LIU Ke-chun<sup>1,2\*</sup>

(1. Key Laboratory for Drug Screening Technology of Shandong Academy of Sciences, Institute of Biology, Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China; 2. Shandong Provincial Engineering Laboratory for Biological Testing Technology, Institute of Biology, Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China;  
3. Penglai Marine (Shandong) CO., LTD., Penglai 265600, China)

**Abstract:** The effect of fructo oligosaccharides and isomaltooligosaccharide in different concentration to promote the intestinal peristalsis is discussed by using zebrafish. We selected the 5 d normal growth zebrafish larvae, and then added

收稿日期:2016-09-30

基金项目:山东省科技发展计划(2011GHY11505);山东省重点研发计划(2015GSF121021);烟台市科技发展计划项目(2015NC046);山东省自主创新及成果转化专项(2014ZZCX02105)

作者简介:侯海荣(1979—),女,实验师,研究方向为药物筛选。E-mail:caomu\_1314@163.com

\*通信作者,韩利文(1980—),男,博士,研究方向为药物筛选及代谢组学研究,E-mail:hanliwen08@126.com;刘可春(1964—),男,博士,研究方向为药物筛选,E-mail:hliukch@sdas.org

to a series of fructo oligosaccharides or isomaltooligosaccharide with a range of concentration as experiment group. The number of intestinal peristalsis was counted in all groups including control group and oligosaccharide and oligoisomaltose treated groups with different dose under the microscope after 24 h. The result showed that fructo oligosaccharides and isomaltooligosaccharide can promote zebrafish larval intestinal peristalsis in the concentration of 125~500 mg/mL in dose-dependent manner. The effect of oligosaccharide was more obvious than oligoisomaltose under same dose. Using zebrafish can achieve early and rapid screening for drugs promoting intestinal peristalsis.

**Key words** : zebrafish; fructo oligosaccharides; isomaltooligosaccharide; number of intestinal peristalsis

肠道是人体最大的免疫器官,也是人体最大的排毒器官<sup>[1-2]</sup>。肠道蠕动力度的强弱在一定程度上影响着肠道的生理功能,且最终影响着人体的健康。de Winter 等<sup>[3]</sup>发现约 50%的患者会因消化道问题就诊,而其中约 30%~40%的患者最终会被确诊为肠蠕动力障碍性疾病。该类疾病的发病机制可能与饮食、神经激素、神经心理、胃酸和幽门螺旋杆菌感染等多种因素相关。肠道蠕动力障碍性疾病多属于功能性疾病,目前尚无特效治疗方法<sup>[4]</sup>。所以,采用快速高效的活体动物模型筛选能够改善肠道蠕动的天然来源的活性物质,对于相关药物、功能食品的开发和肠道疾病的治疗具有重要的意义。

益生元,是指可以选择性刺激肠道中已定植的有益菌群的繁殖或活性的一种膳食补充剂,包括功能性低聚糖、菊粉、膳食纤维和糖醇等<sup>[5]</sup>,其中功能性低聚糖因其具有生产成本较低、功能明确且无毒副作用等优点,现已成为益生元市场的主要的生力军。国内外市场上常见的功能性低聚糖主要包括低聚果糖(fructo oligosaccharides, FOS)、低聚异麦芽糖(isomaltooligosaccharide, IMO)、低聚半乳糖(galactooligosaccharides, GOS)和低聚木糖(xylo-oligosaccharide, XOS)等<sup>[6]</sup>。

低聚果糖又称蔗果低聚糖或果寡糖,是一类重要的功能性低聚糖,广泛存在于自然界中,如菊苣、菊芋、大蒜、洋葱、牛蒡属、香蕉、小麦、蜂蜜和芦笋等都含有<sup>[7]</sup>,是迄今为止研究最为深入的一种低聚糖<sup>[6]</sup>。低聚异麦芽糖又称分支低聚糖或异麦芽寡糖,广泛存在于大麦、小麦、马铃薯和蜂蜜中,是当前食品领域中使用最多、价格相对较低的一种功能性低聚糖<sup>[8]</sup>。

目前有关低聚果糖、低聚异麦芽糖的改善肠功能活性评价多采用传统的在体动物模型(大鼠、小鼠等),如刘晓梅等<sup>[9]</sup>通过建立 Wistar 大鼠便秘模型,发现低聚果糖具有润肠通便作用,且其对维持肠道菌群平衡、抑制肠球菌和肠杆菌的生长有较好的功效;姚景会等<sup>[10]</sup>报道了低聚异麦芽糖对小鼠肠道菌群菌落数量具有调节作用。目前尚无基于斑马鱼模型的低聚果糖、低聚异麦芽糖的肠功能活性方面的研究。

斑马鱼作为近年来被广泛用于疾病模型建立和药物研发的重要的在体模式生物<sup>[11-13]</sup>,具有个体小、易于饲养、胚胎透明易于观察和操作、样品用量少、试验周期短和可实现高通量筛选等优点,且其肠道组成与人类相似,均由内皮细胞、结缔组织、环状肌和外纵肌组成<sup>[14]</sup>。斑马鱼胚胎发育至 72 hpf 时长成幼鱼,在未喂食状态下,首次出现肠道不稳定的自发性收缩。发育至 120~144 hpf,斑马鱼幼鱼肠道会出现自发的蠕动,可通过观察药物对斑马鱼肠蠕动次数的影响而实现药物对斑马鱼肠功能活性的评价。

本研究通过观察低聚果糖及低聚异麦芽糖对处于早期发育阶段的斑马鱼的肠蠕动的促进情况,探讨低聚果糖及低聚异麦芽糖对肠道蠕动的促进作用以及采用斑马鱼动物模型进行药物促进肠功能活性评价的可行性,为适用于促进肠蠕动药物的早期、快速、高通量筛选的动物模型的研究提供依据,为斑马鱼肠功能活性评价的研究奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 主要试剂及其配制

低聚果糖和低聚异麦芽糖(保龄宝生物股份公司,低聚果糖批号 20170202,低聚异麦芽糖批号 20150127)利用胚胎培养水配成 125、250、500 mg/mL 备用;苯硫脲(PTU, Sigma 公司,批号 037K077)配成

1 mg/mL溶液备用;吗叮啉(Toronto Research Chemicals Inc, 25 mg, 批号 1-JTN-136-1),配成 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  备用。

### 1.1.2 实验动物

实验用 AB 系斑马鱼,鱼种来自山东省科学院斑马鱼药物筛选平台。斑马鱼的养殖和繁殖参照 Westerfield 法<sup>[15]</sup>。取卵前一日,将雌雄鱼(1:2)同缸用隔离板分开,第2天光照开始前将隔离板抽掉使雌雄鱼并池,光照后获得受精卵。受精卵用干净培养水洗净后,放入 28  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养。

### 1.1.3 实验仪器

SZX16 型体式荧光显微镜(日本奥林巴斯公司);HPG-280BX 光照培养箱(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司);斑马鱼养殖饲养设备(北京爱生科技公司);6孔板(美国 Costar)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 加药处理

将发育 2 d 的斑马鱼胚胎用吸管移取到 6 孔板上,每孔加入 15 个斑马鱼胚胎以及 6 mL 含有苯硫脲的胚胎培养液(每 1 mL 胚胎培养液中含有苯硫脲母液 10  $\mu\text{L}$ ),隔日更换 3 mL 新配制的苯硫脲和胚胎培养液混合液,连续培养 2 d。斑马鱼发育至第 5 d 后,移去每孔中的苯硫脲和胚胎培养液的混合液,各实验组分别加入不同浓度的受试药物 6 mL,同时设置吗叮啉阳性对照组(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 6 mL)和以胚胎培养液为溶液的空白对照组(6 mL)。每组平行 3 份。药物处理 24 h 后,利用显微镜录像记录斑马鱼肠蠕动次数。

### 1.2.2 斑马鱼肠道蠕动计数

在显微镜下计时 60 s,计数 60 s 内斑马鱼肠蠕动次数,利用 Image-Pro-Plus 软件进行图片分析,比较不同药物处理组与空白对照组之间的斑马鱼肠道蠕动次数差异。

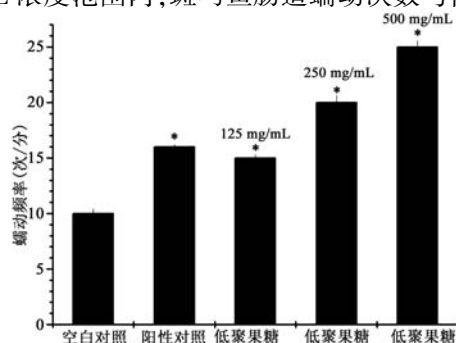
## 1.3 数据分析

采用数据统计软件 SPSS 16.0 对实验数据进行统计分析,用单因素方差分析判断组间差异, $P < 0.05$  则认为所检验的差别有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 低聚果糖对斑马鱼肠道蠕动的影响

将发育至第 5 天的斑马鱼幼鱼置于不同浓度的低聚果糖溶液中,处理 24 h 后,将各组斑马鱼幼鱼分别置于体式显微镜下,观察并记录 60 s 内斑马鱼肠道蠕动次数,并将 60 s 内各药物处理组和对照组中斑马鱼肠道蠕动次数进行对比分析,实验结果如图 1 所示。从图中可以看出,阳性对照组的斑马鱼肠道蠕动次数与空白对照组相比,呈现显著性差异,表明该实验方法可行性良好,实验结果真实可靠。低聚果糖组的斑马鱼肠道蠕动次数与空白对照组相比,呈现显著性差异,且随着低聚果糖样品组浓度的提高,斑马鱼肠道的蠕动次数逐渐增加,在 125 ~ 500 mg/mL 浓度范围内,斑马鱼肠道蠕动次数与低聚果糖的浓度呈正相关性。



\* 代表与空白对照相比, $P < 0.05$

图 1 不同浓度低聚果糖对斑马鱼肠道蠕动的作用比较

斑马鱼经 500 mg/mL 的低聚果糖溶液处理 24 h 后,其肠道收缩有力,蠕动明显,如图 2 所示,每间隔 1 s,斑马鱼肠道蠕动起伏明显,有波峰出现。图 2 中所示为从一个蠕动波开始的 4 s 内的结果,空白对照组斑马鱼 4 s 内肠道蠕动缓慢,未见波形形成;阳性对照组完成近两个波形,蠕动比较迅速;低聚果糖高剂量组蠕动相当迅速,4 s 内总共完成近 3 个波形。以上结果表明,低聚果糖浓度在 125~500 mg/mL 范围内,对斑马鱼肠道的蠕动起促进作用。

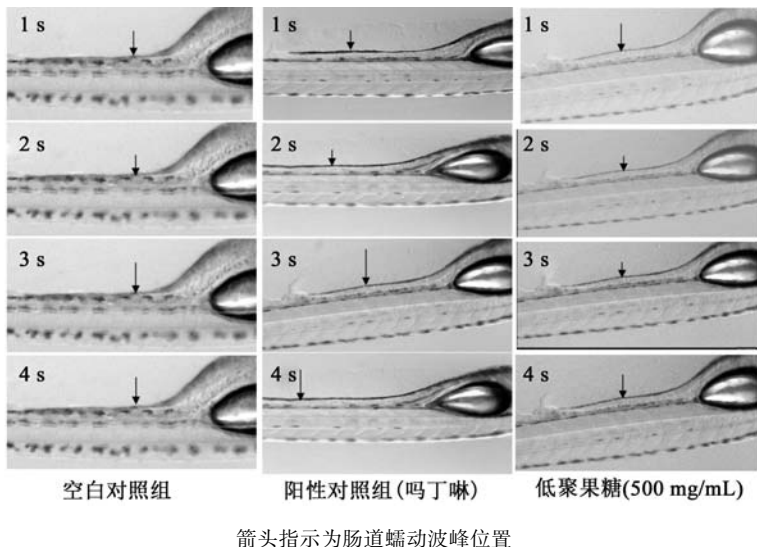


图 2 低聚果糖处理后斑马鱼的肠道蠕动情况

Fig.2 The intestinal peristalsis of zebrafish after treat with ructo oligosaccharide

### 2.2 低聚异麦芽糖对斑马鱼肠道蠕动的影响

将发育至第 5 天的斑马鱼幼鱼置于不同浓度的低聚异麦芽糖溶液中,处理 24 h 后,将各组斑马鱼幼鱼分别置于体式显微镜下,观察并记录 60 s 内斑马鱼肠道蠕动次数,并将 60 s 内各药物处理组和对照组中斑马鱼肠道蠕动次数进行对比分析,实验结果如图 3 所示。从图中可以看出,阳性对照组的斑马鱼肠道蠕动次数与空白对照组相比,呈现显著性差异,表明该实验方法可行性良好,实验结果真实可靠。低聚异麦芽糖组的斑马鱼肠道蠕动次数与空白对照组相比,呈现显著性差异,且随着低聚异麦芽糖样品组浓度的提高,斑马鱼肠道的蠕动次数逐渐增加,在 125~500 mg/mL 浓度范围内,斑马鱼蠕动次数与低聚异麦芽糖的浓度呈正相关性。

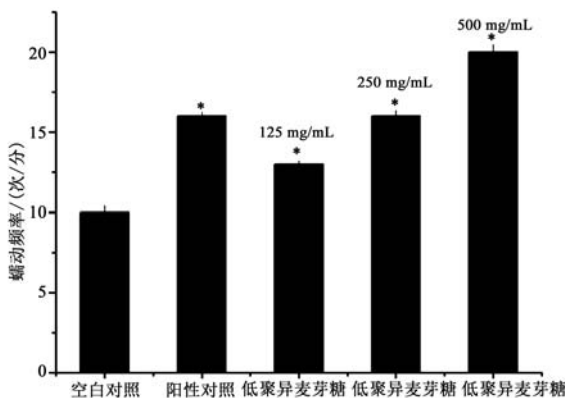


图 3 不同浓度低聚异麦芽糖对斑马鱼肠道蠕动的作用比较

Fig.3 Comparison of effects of isomaltooligosaccharides in different concentrations on the intestinal peristalsis of zebrafish

斑马鱼经 500 mg/mL 的低聚异麦芽糖溶液处理 24 h 后,其肠道收缩有力,蠕动明显,如图 4 所示,每隔 1 s,斑马鱼肠道蠕动起伏明显,有波峰出现。以上结果均表明,低聚异麦芽糖在浓度 125~500 mg/mL 时,对肠道的蠕动起促进作用。图 4 中,空白对照组斑马鱼 4 s 内肠道蠕动缓慢,未形成波形;阳性对照组完成近两个波形,蠕动比较迅速;低聚异麦芽糖高剂量组蠕动迅速,也完成近两个波形。

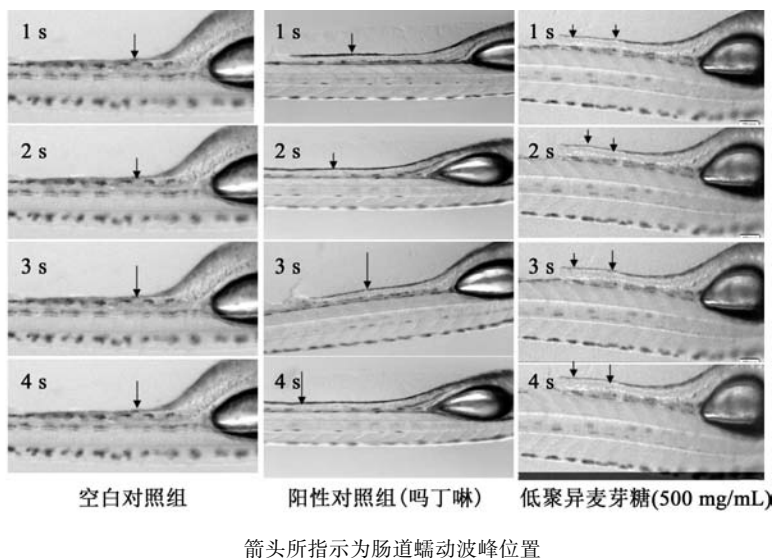


图 4 低聚异麦芽糖处理后斑马鱼的肠道蠕动情况

Fig.4 The intestinal peristalsis of zebrafish after treat with isomaltooligosaccharide

### 2.3 低聚果糖和低聚异麦芽糖促进斑马鱼肠道蠕动的差异

斑马鱼经过低聚果糖和低聚异麦芽糖溶液处理 24 h 后,均能发现肠道起伏明显,有波峰出现的情况,二者比较,低聚果糖较低聚异麦芽糖对斑马鱼肠道蠕动促进作用更加明显。此结果与现有报道的低聚果糖和低聚异麦芽糖所需最低起效量的差异一致,低聚果糖每日摄取最低有效剂量为 5.0 g<sup>[16]</sup>,而低聚异麦芽糖每日摄取最低有效剂量为 10.0 ~ 18.0 g<sup>[17]</sup>。但是,经过显微镜观察,低聚异麦芽糖出现双波峰情况比较明显,出现这种差异的原因有待进一步地研究。

## 3 讨论

肠道运动功能是消化道最主要的功能之一,适当地提高肠道蠕动,可以促进消化液的分泌,增强消化道的消化、吸收能力,并最终提高机体生命活力。但是由于肠道运动的调节机制非常复杂,如何简便、有效地加强其蠕动能力尚需研究。目前常见的治疗方式仍是通过外源性药物等提高肠道运动功能,但并不能保证根治疾病,且外源性药物的安全性及长期服用是否会产生成瘾性也制约此类药物的发展,因此,采用快速高效的活体动物模型对天然来源的活性物质进行筛选,既能有效提高药物的筛选速度,又能保证所筛选的药物的安全性,可谓一举两得。

我们以新型模式生物斑马鱼作为实验动物,通过研究发现低聚果糖和低聚异麦芽糖在一定浓度内可以有效提高早期发育的斑马鱼肠道蠕功能,低聚果糖及低聚异麦芽糖的浓度与斑马鱼肠蠕动次数呈正相关,且相同浓度条件下,低聚果糖促进斑马鱼肠道蠕动的能力强于低聚异麦芽糖。该研究结果与传统在体模式生物(大鼠、小鼠)的相关实验结果一致,但采用斑马鱼动物模型所耗费的实验周期更短、操作更简便、结果更易于观察且实验成本低廉。

采用斑马鱼模型进行药物促进肠功能活性评价,可弥补小型哺乳动物模型无法快速验证其结果<sup>[18]</sup>的不足,能够实现促进肠蠕动药物的早期、快速、高通量筛选,为斑马鱼肠功能活性评价的研究奠定理论基础,对肠功能相关药物或者保健食品产品的研发将具有重要的意义。

## 参考文献:

- [1] 刘宝珍,薛春霞,金世禄.肠道菌群与消化系疾病[J]. 内蒙古中医药,2011,30(3):86-88.
- [2] 郎媛媛.益生菌降低肿瘤发生率[J].中国保健营养,2015(2):74-75.
- [3] de WINTERB Y, de MAN J G. Interplay between inflammation, immune system and neuronal pathways: Effect on gastrointestinal motility [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16 (44):5523-5535.
- [4] LEE A-L, KIM C-B. The effect of erythromycin on gastrointestinal motility in subtotal gastrectomized patients [J]. J Korean Surg Soc, 2012, 82(3):149-155.
- [5] 孙志慧,石茹,张秋莲.益生元在改善肠屏障功能中的应用[EB/OL].[2016-05-13].[http://epub.cnki.net/kns/brief/default\\_result.aspx](http://epub.cnki.net/kns/brief/default_result.aspx).
- [6] 李伟. 功能性低聚糖的酶法合成及其生理功能评价[D].南京:南京农业大学,2010.
- [7] 丁晓雯,周才琼.保健食品原理[M].重庆:西南师范大学出版社,2008:179-180.
- [8] 王良东.低聚异麦芽糖性质、功能、生产和应用[J].粮食与油脂,2008(4):43-47.
- [9] 刘晓梅,彭芝榕,倪学勤,等.低聚果糖、乳酸杆菌对便秘模型大鼠的通便功能影响[J].食品科学,2013,34(11):296-299.
- [10] 姚景会,冉陆,李志刚,等.异麦芽低聚糖调节肠道菌群作用的研究[J].中国食品卫生杂志.1999,1(2):6-8.
- [11] KARI G, RODECK U, DICKLER A P. Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery [J]. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2007, 82(1):70-80.
- [12] PENBERTHY W T, SHAFIZADEH E, LIN S. The zebrafish as a model for human disease [J]. Front Biosci, 2002, 7:d1439-1453.
- [13] 李森.地塞米松磷酸钠导致斑马鱼颅面部发育异常的研究[D].武汉:华中科技大学,2009.
- [14] RICH A. A new high-content model system for studies of gastrointestinal transit: the zebrafish [J]. Neurogastroenterol Motil, 2009, 21(3):225-228.
- [15] WESTERFIELD M, WEGNER J, JEGALIAN B G, et al. Specific activation of mammalian Hox promoters in mosaic transgenic zebrafish [J]. Genes Dev, 1992, 6(4):591-598.
- [16] 王良东,陈建文,吴嘉麟.功能性低聚糖制备[J].粮食与油脂,2008(7):38-42.
- [17] 李茂龄.低聚异麦芽糖的生理功能研究[J].中国食品添加剂,2002(2):37-39.
- [18] COWAN A, EARNEST D L, LIGOZIO G, et al. Omeprazole-induced slowing of gastrointestinal transit in mice can be countered with tegaserod [J]. European Journal of Pharmacology, 2005, 517(1/2):127-131.