

· 药学基础 ·

## 黄芪囊泡样纳米颗粒通过调节肠道菌群降低 db/db 糖尿病小鼠 血糖的作用机制分析

高文静<sup>1</sup>, 侯敏<sup>1,2</sup>, 陈潇潇<sup>1</sup>, 王攀<sup>1</sup>, 任钧国<sup>1\*</sup>, 刘建勋<sup>1</sup>

(1. 中国中医科学院西苑医院基础医学研究所, 中药药理北京市重点实验室, 北京 100091;  
2. 北京中医药大学, 北京 100029)

**[摘要]** 目的:研究黄芪水煎液中囊泡样纳米颗粒(VLNs)的提取方法及特性,探讨黄芪VLNs通过调节db/db小鼠肠道菌群来降低血糖的作用机制。方法:采用超速离心法和尺寸排阻色谱法分别富集黄芪水煎液中的VLNs,通过透射电子显微镜、纳米颗粒跟踪分析仪分析黄芪水煎液中VLNs的形态、粒径、浓度。选用db/db糖尿病小鼠,按血糖值随机分为模型组,黄芪VLNs高、中、低剂量(21.1, 10.6, 5.3 g·kg<sup>-1</sup>)组和二甲双胍组(0.25 g·kg<sup>-1</sup>),每组7只,另设7只C57BL/6小鼠作为正常组,灌胃给药3周(每日1次),每周观察小鼠空腹血糖变化;苏木素-伊红(HE)染色观察糖尿病小鼠肝脏和胰腺病理形态情况;采集小鼠粪便进行肠道微生物16S rRNA多样性检测。结果:2种方法所得纳米颗粒粒径均在200 nm左右,超速离心法提取的黄芪VLNs具有典型的茶托状,其浓度为3.0×10<sup>11</sup>个/mL;尺寸排阻色谱法所得黄芪VLNs形态相对较差,其浓度为2.2×10<sup>11</sup>个/mL。给药3周后,与模型组比较,黄芪VLNs高、中、低剂量组均能显著降低糖尿病小鼠的空腹血糖(P<0.05, P<0.01);可改善肠道菌群失调,显著降低厚壁菌门/拟杆菌门比例,提高有益菌相对丰度,降低有害菌相对丰度。结论:黄芪VLNs可能通过调节肠道菌群中厚壁菌门/拟杆菌门的比例来降低db/db糖尿病小鼠的血糖。

**[关键词]** 黄芪; 囊泡样纳米颗粒; 超速离心法; 尺寸排阻色谱法; 空腹血糖; 肠道菌群; 粒径分布

**[中图分类号]** R587;R94;R28;R378.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)14-0111-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20211556 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20210425.1531.001.html>

**[网络出版日期]** 2021-04-26 9:03

### Mechanism of Astragali Radix Vesicle-like Nanoparticles for Reducing Blood Glucose in db/db Diabetic Mice by Regulating Gut Microbiota

GAO Wen-jing<sup>1</sup>, HOU Min<sup>1,2</sup>, CHEN Xiao-xiao<sup>1</sup>, WANG Pan<sup>1</sup>, REN Jun-guo<sup>1\*</sup>, LIU Jian-xun<sup>1</sup>

(1. Beijing Key Laboratory of Pharmacology of Traditional Chinese Medicine, Institute of Basic Medical Sciences, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China; 2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the extraction method and characteristics of vesicle-like nanoparticles (VLNs) in Astragali Radix decoction, and to explore the mechanism of the VLNs in reducing blood glucose by regulating the gut microbiota of db/db diabetic mice. **Method:** Ultracentrifugation and size exclusion chromatography were used to enrich VLNs from Astragali Radix decoction, and the morphology, particle size and concentration of the VLNs were analyzed by transmission electron microscope and nanoparticle tracking analyzer. The db/db diabetic mice were randomly divided into model group, Astragali Radix VLNs high-,

**[收稿日期]** 20210304(016)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09301018);中国中医科学院基本科研业务费自主选题(ZZ11-027,zz110324)

**[第一作者]** 高文静,在读硕士,从事中药药理学研究,E-mail:920019805@qq.com

**[通信作者]** \*任钧国,研究员,博士生导师,从事中药药理学研究,Tel:010-62835612,E-mail:reek2003@163.com

medium- and low-dose (21.1, 10.6, 5.3 g·kg<sup>-1</sup>) groups and metformin group (0.25 g·kg<sup>-1</sup>) according to their blood glucose levels. There were 7 mice in each group, and another 7 C57BL/6 mice were set as the normal group. The mice were given intragastrically for 3 weeks (once a day), and the changes of fasting blood glucose were observed every week. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological morphology of liver and pancreas of diabetic mice. The feces of mice were collected for 16S rRNA diversity detection of intestinal microbes. **Result:** The size of the nanoparticles obtained by the two methods was about 200 nm. Astragali Radix VLNs extracted by ultracentrifugation had a typical saucer-like shape with the concentration of 3.0×10<sup>11</sup> particles·mL<sup>-1</sup>. The morphology of Astragali Radix VLNs obtained by size exclusion chromatography was relatively poor with the concentration of 2.2×10<sup>11</sup> particles·mL<sup>-1</sup>. After 3 weeks of administration, compared with the model group, Astragali Radix VLNs high-, medium- and low-dose groups could significantly reduce the fasting blood glucose of diabetic mice ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). The VLNs could improve the gut microbiota dysbiosis, significantly decrease the ratio of Firmicutes/Bacteroidota, and increase the relative abundance of beneficial bacteria and reduce the relative abundance of harmful bacteria. **Conclusion:** Astragali Radix VLNs may reduce the blood glucose of db/db diabetic mice by adjusting the ratio of Firmicutes/Bacteroidota in the intestinal flora.

**[Keywords]** Astragali Radix; vesicle-like nanoparticles; ultracentrifugation; size exclusion chromatography; fasting blood glucose; intestinal flora; particle size distribution

黄芪是中医临床上常用的益气药,具有补气固表、利尿托毒、排脓、敛疮生肌等功效。现代药理学研究表明,黄芪具有降血糖、调节免疫、改善心功能等作用,是治疗糖尿病、心血管疾病、肿瘤、免疫性疾病等常用中药之一<sup>[1-4]</sup>。据统计,目前已从黄芪中分离和鉴定出多糖类、皂苷类、黄酮类、异黄酮类、甾醇、氨基酸和挥发油等成分<sup>[5]</sup>,其中黄酮类、皂苷类和多糖类是黄芪防治糖尿病最主要的三类成分<sup>[6]</sup>,但也有可能还有其他尚未被发现的具有降糖作用的活性成分。

近年来,科研人员在植物类中药中发现了囊泡样纳米颗粒(VLNs)的存在,且研究表明其具有多种生物活性。例如,蒲公英、红景天来源的VLNs具有抗炎作用,能够抑制白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子(TNF)等炎症因子的产生,对肺纤维化也具有良好的治疗作用<sup>[7]</sup>;生姜来源的VLNs在抑制分泌蛋白血凝素的表达中起着重要作用,并影响其他线粒体和细胞质蛋白的表达,如热休克蛋白、轴突和运动蛋白,以促进肠道伤口愈合<sup>[8]</sup>;人参来源的VLNs具有抗肿瘤作用<sup>[9]</sup>。这些报道为中药新活性成分的研究提供了新的切入点<sup>[10]</sup>。

VLNs的提取主要包括超速离心法、尺寸排阻色谱法、超滤法、聚合沉淀法<sup>[10]</sup>等。中药VLNs是将新鲜中药榨汁<sup>[8-9]</sup>或中药饮片煎煮后<sup>[7]</sup>得到的药汁通过超速离心获得。基于此,本实验拟比较超速离心法和尺寸排阻色谱法,确定分离黄芪水煎液中

VLNs的方法,对VLNs特征进行鉴定与分析,并从肠道菌群角度探讨黄芪VLNs对db/db糖尿病小鼠肠道菌群的调节作用,为黄芪VLNs的后续研究提供实验依据。

## 1 材料

ES-1100型电子天平(长沙湘平科技发展有限公司),CR21G III型低温高速离心机和55P-72型超速离心机(日本Hitachi公司),JEM1230型透射电子显微镜(日本Jeol公司),ZetaView PMX 110型纳米颗粒跟踪分析仪(德国Particle Metrix公司),Accu-Chek Performa卓越型血糖仪(德国罗氏诊断有限公司),GeneAmp® 9700型聚合酶链式反应(PCR)扩增仪(美国应用生物系统公司),Ci-S型倒置显微镜(日本尼康公司)。

磷酸盐缓冲液(PBS,北京索莱宝公司,批号P1020),罗氏卓越金锐血糖试纸(德国罗氏诊断有限公司,批号478882),qEV70型分离柱(新西兰Izon Science公司,批号10643),盐酸二甲双胍片(中美上海施贵宝制药有限公司,批号国药准字H20023370,批号ABS0450),E.Z.N.A.® Soil DNA kit(美国Omega公司,批号M9636020000K12T004);黄芪饮片由河北百草康神药业有限公司提供,批号2008012,经中国中医科学院西苑医院张鹏研究员鉴定为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* 的干燥根(产地甘肃),符合2020年版《中华人民共和国药典》的相关规定。

SPF级雄性C57BL/6小鼠,5周龄;SPF级雄性db/db小鼠,5周龄,均购自北京唯尚立德生物科技有限公司,合格证号SCXK(京)2016-0009,实验单位使用许可证号SYXK(京)2018-0018,动物饲养于中国中医科学院西苑医院基础研究所SPF级动物实验室,相对湿度40%~60%,温度(22±2)℃。动物实验符合中国中医科学院西苑医院医学伦理委员会要求,批准号2021XLC001-2。

## 2 方法

### 2.1 黄芪VLNs的提取与表征

**2.1.1 黄芪水煎液制备** 取黄芪饮片200 g,加入12倍量蒸馏水回流提取90 min,过200目筛;药渣加入12倍量蒸馏水回流提取90 min,过200目筛;合并2次煎煮液,于旋转蒸发仪中减压浓缩至200 mL。

**2.1.2 超速离心法富集黄芪VLNs** 取黄芪煎煮液100 mL于4℃,300×g离心10 min,取上清液,置于50 mL离心管中,于4℃,3 000×g离心30 min,取上清置于另一50 mL的离心管中,于4℃,1万×g离心30 min,取上清置于超速离心机配套离心管中,配平后置于超速离心机中,于4℃,15万×g离心90 min。弃上清,用PBS 200 μL吹打离心管底部,重悬沉淀并吸取至合适的冻存管中,置于-80℃冻存备用。

**2.1.3 尺寸排阻色谱法富集黄芪VLNs** 取黄芪煎煮液100 mL于4℃,300×g离心10 min,取上清液,置于50 mL离心管中,于4℃,3 000×g离心30 min,取上清置于另一50 mL离心管中,于4℃,1万×g离心30 min,过0.45 μm微孔滤膜,得滤液约10 mL。向qEV70型分离柱的储液器中加入PBS约100 mL,当PBS液面达储液器底部筛板2 mm时,更换15 mL的新收集管,用移液枪加入上述得到的滤液10 mL。当液面达到筛板顶部时,添加PBS冲洗分离柱,接收液体积达25 mL时,在分离柱垂直下方更换新的收集管,开始收集含有黄芪VLNs的溶液。当流出液体积达5 mL时,收集完毕,该溶液即富含黄芪VLNs。将收集的样本-80℃冻存备用。

**2.1.4 黄芪VLNs的形态表征** 取上述2种方法获得的黄芪VLNs各20 μL,呈水滴状滴至电镜铜网中,使滴液在铜网上保留片刻(>1 min),2%磷钨酸溶液负染固定1~10 min,滤纸吸干后室温自然晾干,透射电子显微镜(TEM)观察。

**2.1.5 黄芪VLNs粒径、颗粒分布与浓度检测** 以去离子水清洗样本池,纳米颗粒跟踪分析仪用聚苯乙烯微球(110 nm)校准;用PBS清洗样本池;黄芪VLNs用PBS稀释至浓度约1×10<sup>7</sup>个/mL(具体稀

倍数需要参照样本实际情况),待测。

### 2.2 动物实验

**2.2.1 动物分组与处理** 将35只db/db小鼠适应性饲养7 d,测定各组小鼠空腹血糖值,按血糖值随机分为模型组,黄芪VLNs高、中、低剂量组和二甲双胍组,每组7只;另设7只C57BL/6小鼠作为正常组,各组小鼠均用普通饲料喂养。按成人日服黄芪生药量30 g为低剂量,60 g为中剂量,120 g为高剂量计算,成人按体质量70 kg计算,根据体表面积换算小鼠的等效剂量为成人12.33倍,即黄芪VLNs高、中、低剂量组分别按21.1,10.6,5.3 g·kg<sup>-1</sup>(以生药量计给药),二甲双胍组则按剂量250 mg·kg<sup>-1</sup>给药,正常组给予等体积蒸馏水,各组均以10 mL·kg<sup>-1</sup>的体积灌胃给药,每日1次,连续3周。

**2.2.2 空腹血糖检测** 每周禁食6 h,采用尾尖采血方式检测小鼠血糖。

**2.2.3 胰腺与肝脏病理组织形态** 实验结束后处死小鼠,取肝脏和胰腺经4%多聚甲醛溶液室温固定,常规包埋,切片,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察组织病理形态。

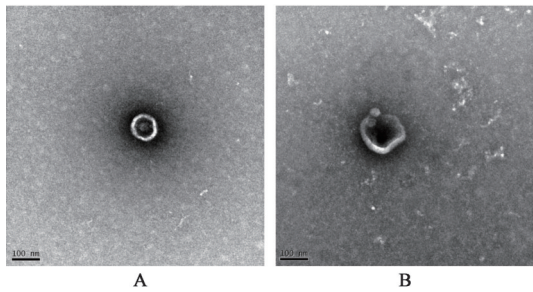
**2.2.4 肠道菌群检测** 实验结束后取小鼠直肠中的粪便3~5颗,置于冷冻管,并迅速放入液氮,备用。根据E.Z.N.A.<sup>®</sup> soil DNA kit说明书进行微生物群落总DNA抽提,然后进行PCR扩增,Illumina Miseq测序及原始数据处理。最后用UPARSE软件<sup>[11]</sup>(<http://drive5.com/uparse/>, version 7.1),根据97%<sup>[11-12]</sup>的相似度对序列进行操作分类单元(OTUs)聚类,利用RDP Classifier<sup>[13]</sup>(<http://rdp.cme.msu.edu/>, version 2.2)对每条序列进行物种分类注释,比对SILVA 16S rRNA数据库(v138),设置比对阈值70%。在美吉生信云平台([www.majorbio.com](http://www.majorbio.com))进行群落组成分析及物种差异分析。

**2.3 统计学分析** 实验结果用 $\bar{x}±s$ 表示,运用SPSS 21.0软件对实验数据进行统计分析,多组数据比较采用单因素方差分析,等级资料采用非参数统计的秩和检验, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 黄芪VLNs的形态** TEM结果显示,超速离心法获得的黄芪VLNs呈典型茶托状或凹陷的半球状,背景干净;尺寸排阻色谱法提取的黄芪VLNs形态较差,囊泡有所损坏,背景相对干净,见图1。

**3.2 黄芪VLNs的粒径大小、颗粒分布与浓度** 测量结果显示,超速离心法所得到的黄芪VLNs粒径相对较小,分布较集中,浓度7.4×10<sup>7</sup>个/mL(稀



A. 超速离心法; B. 尺寸排阻色谱法

图1 黄芪VLNs的TEM( $\times 120\ 000$ )

Fig. 1 TEM of Astragalus Radix VLNs( $\times 120\ 000$ )

倍数4 000倍),原始浓度 $3.0 \times 10^{11}$ 个/mL,粒径峰值165.8 nm,峰面积占比95.2%,平均粒径172.4 nm,处于12.5~457.5 nm分布。尺寸排阻色谱法所得黄芪VLNs粒径相对较大、范围较宽,浓度 $4.3 \times 10^7$ 个/mL(稀释倍数5 000倍),原始浓度 $2.2 \times 10^{11}$ 个/mL,粒径峰值193.2 nm,峰面积占比90.9%,实测平均粒径216.7 nm,处于12.5~612.5 nm分布。说明黄芪VLNs的提取更合适采用超速离心法。

**3.3 黄芪VLNs对db/db小鼠血糖的影响** 与正常组比较,模型组小鼠的血糖在给药的第1,2,3周均显著升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较,黄芪VLNs高、中、低剂量组小鼠血糖在给药的第1,2周无明显变化,第3周时,黄芪VLNs各剂量组和二甲双胍组小鼠的血糖显著降低( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表1。

表1 黄芪VLNs对db/db糖尿病小鼠血糖的影响( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

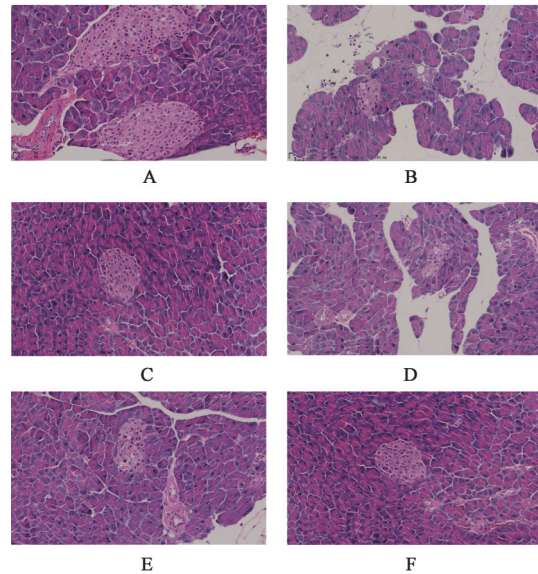
Table 1 Effects of Astragalus Radix VLNs on blood glucose in db/db diabetic mice ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	血糖/mmol·L <sup>-1</sup>		
		1周	2周	3周
正常		8.4±1.1	8.6±1.3	8.8±0.8
模型		13.2±1.4 <sup>1)</sup>	12.9±2.0 <sup>1)</sup>	14.6±2.0 <sup>1)</sup>
黄芪VLNs	21.1	13.7±2.7	11.6±2.4	12.2±1.1 <sup>3)</sup>
	10.6	11.2±0.4	12.0±1.4	12.2±1.9 <sup>3)</sup>
	5.3	11.3±0.6	12.5±1.3	12.6±1.7 <sup>2)</sup>
二甲双胍	0.25	14.0±2.4	12.4±1.4	11.3±1.3 <sup>3)</sup>

注:与正常组比<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.01$ (表2同)。

**3.4 胰腺HE染色** 正常组胰腺组织中胰岛呈圆形均匀分布,数目及面积均未见减少,胰岛细胞胞浆充盈,未见变性及坏死。模型组中胰腺组织中胰岛分散,胰岛数目较少,面积减少,形成呈长条撕裂状,胰岛细胞空泡化变性严重,可见凋亡细胞,纤维化形成。黄芪VLNs高剂量组胰岛数目及胰岛内细胞数目明显增加,胰岛细胞空泡化变性程度低,凋

亡细胞少见,未见纤维化改变;中剂量组胰岛数目及胰岛内细胞数目增加,轻度空泡化变性,凋亡细胞少见,轻度纤维化改变;低剂量组胰岛较分散,胰岛数目及胰岛内细胞数目减少,胰岛细胞轻度空泡化变性,凋亡细胞可见,轻度纤维化改变。二甲双胍组胰岛结构及胰岛细胞内排列较完整均匀,胰岛数目减少不明显,面积轻度减少,空泡化程度低,凋亡细胞偶见,未见明显纤维化。见图2。



A. 正常组(nor); B. 模型组(mod); C. 黄芪VLNs高剂量组(hig); D. 黄芪VLNs中剂量组(med); E. 黄芪VLNs低剂量组(low); F. 二甲双胍组(con)(图3同)

图2 各组小鼠胰腺组织的病理观察(HE, $\times 200$ )

Fig. 2 Pathological morphology of pancreatic tissue of mice in each group (HE, $\times 200$ )

**3.5 肝脏HE染色** 模型组肝小叶结构消失,肝细胞肿胀明显,排列紊乱,细胞内出现大脂肪空泡,胞浆内可见大小不一脂滴,汇管区扩张,肝细胞周围及汇管区伴有炎症细胞浸润。二甲双胍组与黄芪VLNs高剂量组肝小叶结构紊乱,肝细胞轻度肿胀,排列不规则,细胞内出现小脂肪空泡,灶性汇管区扩张,汇管区少量炎症细胞浸润。黄芪VLNs中剂量组肝小叶结构紊乱,肝细胞轻度肿胀,排列不规则,细胞内出现大小不一脂肪空泡,汇管区扩张,血管增生、扩张,汇管区少量炎症细胞浸润;低剂量组肝小叶结构紊乱,肝细胞肿胀明显,排列紊乱,细胞内出现大小不易的脂肪空泡,灶性汇管区扩张,肝细胞及汇管区伴有炎症细胞浸润。见图3。

**3.6 黄芪VLNs对db/db小鼠肠道菌群的影响**

**3.6.1 物种组成情况** 各组之间有40个物种为共有物种,正常组和黄芪VLNs高剂量组各有1个为

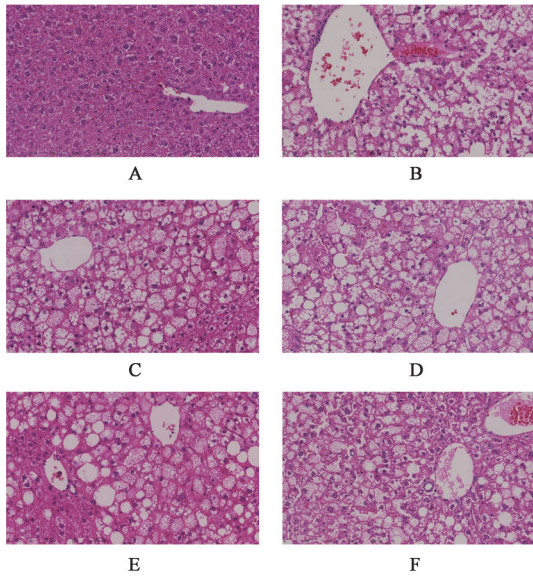


图3 各组小鼠肝脏组织的病理观察(HE, ×200)

Fig. 3 Pathological morphology of liver tissue of mice in each group (HE, ×200)

特有物种,黄芪VLNs中、低剂量组和二甲双胍组各有2,3,6个特有物种;而模型组含有16个特有物种。

表2 各组小鼠肠道菌群物种差异分析( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

Table 2 Species difference analysis of intestinal flora of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Bacteroidota	Firmicutes	Muribaculaceae	Lachnospiraceae	Lactobacillaceae
正常		87.25±4.96	11.10±4.76	73.32±9.94	7.17±3.50	0.30±0.26
模型		49.91±17.98 <sup>1)</sup>	46.26±18.48 <sup>1)</sup>	37.94±9.51 <sup>1)</sup>	24.01±5.72 <sup>1)</sup>	9.10±11.62
黄芪VLNs	21.1	78.22±8.36 <sup>3)</sup>	19.93±8.48 <sup>3)</sup>	60.76±3.25	11.66±7.44 <sup>2)</sup>	2.2±3.72
	10.6	77.02±5.56 <sup>3)</sup>	20.61±4.78 <sup>3)</sup>	56.72±9.32	12.82±2.97	2.80±2.64
	5.3	67.73±5.94	29.49±5.60	39.03±15.43	22.98±2.58	2.15±1.73
二甲双胍	0.25	75.29±6.79 <sup>3)</sup>	21.27±6.42 <sup>3)</sup>	54.96±15.12	9.68±6.34 <sup>3)</sup>	2.75±0.94

**3.6.2 LEfSe 多级物种差异判别分析** LEfSe可以用于区别2个或2个以上的类群,其不同颜色节点代表在对应组别中显著富集,且对组间差异存在显著影响的微生物类群。线性判别分析(LDA)可以估算每个物种丰度对差异效果影响的大小,LDA分值越大,代表物种丰度对差异效果影响越大。由图4可知,正常组中其丰度对差异效果影响较大的物种有拟杆菌门,拟杆菌纲(Bacteroidia),拟杆菌目(Bacteroidales)和Muribaculaceae等。模型组中影响较大的菌群有厚壁菌门,杆菌纲(Bacilli),乳杆菌目(Lactobacillales)和乳杆菌科等。黄芪VLNs高剂量组中对群落结构影响较大的有链球菌科(Streptococcaceae),理研菌科(Rikenellaceae)和Marinifilaceae。黄芪VLNs中剂量组中对群落结构影响较大的有Butyricocccaceae。黄芪VLNs低剂

种。提示正常组和黄芪VLNs高剂量组物种组成更为相近。物种组成多样性分析显示,拟杆菌门(Bacteroidota)是正常组小鼠菌群的绝对优势菌门;厚壁菌门(Firmicutes)为次要优势菌门。与正常组相比,模型组小鼠厚壁菌门和拟杆菌门相对丰度具有显著差异( $P<0.01$ )。经药物治疗后,给药组厚壁菌门/拟杆菌门比率逐渐接近正常组水平,其中黄芪VLNs高剂量组效果最明显,见表2。小鼠菌群科水平分析显示,拟杆菌门下Muribaculaceae为正常组小鼠优势菌科,其相对丰度达73.32%,模型组则降至37.94%;黄芪VLNs高、中、低剂量组和二甲双胍组中的Muribaculaceae含量相对模型组有所增加。相对于正常组,模型组中厚壁菌门下的毛螺菌科(Lachnospiraceae)和乳杆菌科(Lactobacillaceae)相对丰度增加,其中毛螺菌科具有统计学意义( $P<0.01$ )。与模型组比较,黄芪VLNs高、中、低剂量组中毛螺菌科和乳杆菌科相对丰度均有所减少,其中以高剂量组效果较佳。见表2。

量组中对群落结构影响较大的有梭菌纲(Clostridia),毛螺菌科和毛螺菌目(Lachnospirales)等。二甲双胍组中对群落结构影响较大的有丹毒丝菌目(Erysipelotrichales),韦荣球菌科(Erysipelotrichaceae)和肠杆菌科(Enterobacteriaceae)等。

#### 4 讨论

目前,植物VLNs的提取主要采用超速离心法<sup>[7-10,14-15]</sup>。此外,细胞外囊泡的常用提取方法还有尺寸排阻色谱法、聚合沉淀法、超滤法等<sup>[16]</sup>;其中尺寸排阻色谱法是根据分子粒径大小进行分离,操作简单,能够极大地保留囊泡活性。超速离心法则是通过采用不同离心力,将样品中各种组分按沉降系数不同而进行逐级分离的方法,是提取VLNs最经典的方法,但需要用到超速离心机及配套的离心管

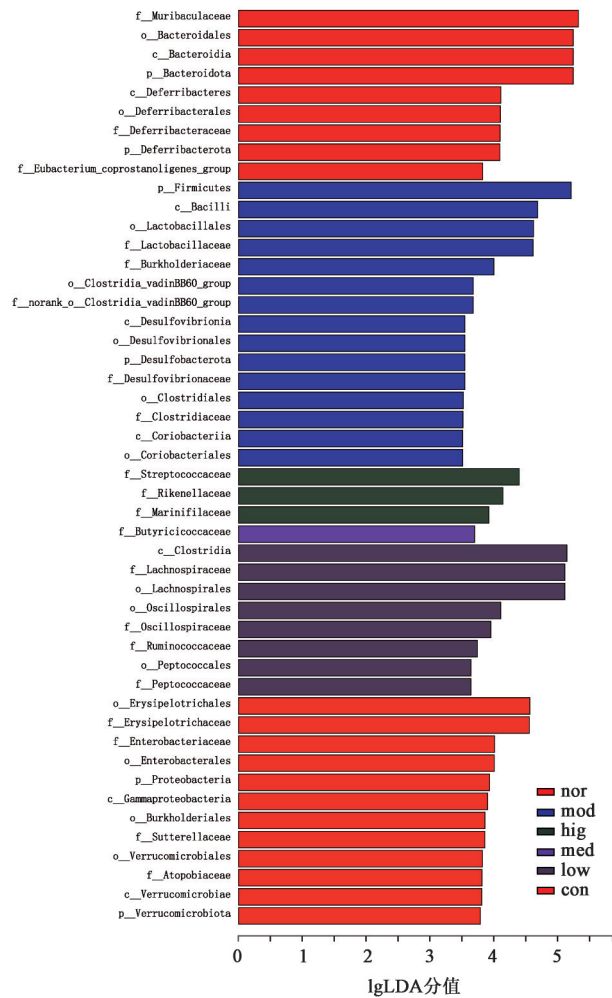


图4 各组样本肠道菌群的LEfSe多级物种差异判别分析  
Fig. 4 LEfSe multi-level species difference discriminant analysis of intestinal flora in each group

和适配器,时间长、步骤相对繁琐,不适合实验室大样本的提取<sup>[10]</sup>。

在本研究中,采用超速离心法及尺寸排阻色谱法分离、提取黄芪VLNs,并比较了2种方法的提纯效果。选择对黄芪水煎液进行提取,采用300×g离心10 min,3 000×g离心30 min,1万×g离心30 min进行初步提取,然后利用15万×g离心90 min的超速离心法及尺寸排阻色谱法进行最后的分离、提取。2种方法获得的黄芪VLNs均具有类似于哺乳动物的细胞外囊泡的结构,但超速离心法提取的黄芪VLNs形态良好、背景干净,且粒径分布较为集中;尺寸排阻色谱法获得的黄芪VLNs粒径相对较大,粒径范围较宽,电镜图背景较杂,囊泡有损坏,可能是由于黄芪含有丰富的糖类,在过0.45 μm滤膜时,阻力较大,对囊泡有所损坏。因此,针对含糖量较为丰富的黄芪来说,超速离心法更为适合。而根据统计数据显示,一般100 g植物原料可以提取

得到VLNs 320~450 mg<sup>[17]</sup>。故笔者对超速离心法的提取率进行了考察,经多次试验,发现100 g黄芪大约可以提取到VLNs 400 mg。说明采用超速离心法获得的黄芪VLNs产量较高,有利于其在应用中的大规模批量生产。

黄芪对糖尿病具有良好的治疗作用,能够显著降低糖尿病小鼠血糖,改善胰岛素抵抗<sup>[18]</sup>。黄芪多糖和黄芪皂苷是黄芪起到降糖作用的主要成分,每天给大鼠灌胃黄芪皂苷,连续灌胃4周,每周测定各组大鼠空腹血糖水平,结果发现其可有效降低实验性糖尿病大鼠血糖<sup>[19]</sup>;黄芪多糖对1型和2型糖尿病小鼠血糖也具有辅助性降低血糖,可发挥改善胰岛素抵抗等作用<sup>[20-21]</sup>。另有研究报道,黄芪饮片及其有效部位(多糖、黄酮、皂苷等)给糖尿病大鼠灌胃30 d后,其血糖均显著下降<sup>[22]</sup>。因此,本实验采用灌胃方式评价了黄芪VLNs对db/db糖尿病小鼠的降糖作用,结果表明黄芪VLNs给药3周即可产生明显的降糖作用。与黄芪多糖700 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>的给药剂量相比<sup>[23]</sup>,黄芪VLNs在给药时间和给药剂量上均占有一定的优势。同时,有研究报道黄芪水煎液以3 g·kg<sup>-1</sup>(成人每日服用30 g)给大鼠灌胃,其降糖作用不具显著性<sup>[24]</sup>。而黄芪VLNs低剂量(成人每日服用30 g)依旧具有显著降糖作用。另外,笔者于第3周实验结束前检测了小鼠糖化血红蛋白,但未见明显变化,可能是由于糖化血红蛋白是反映2~3个月的血糖平均水平变化,本实验给药周期较短,故无明显变化;对小鼠的肝脏和胰腺组织进行了HE染色观察,发现黄芪VLNs高剂量组对组织形态具有较好的改善作用,进一步证实了黄芪VLNs对糖尿病小鼠具有一定的治疗作用。

菌群失调是推动肥胖、糖尿病等代谢性疾病发展的重要因素之一,临床研究发现糖尿病患者体内的肠道微生物丰度区别于健康志愿者<sup>[25-27]</sup>,因此调节肠道菌群可能是治疗糖尿病的有效途径之一。目前,大量研究认为肠道微生物是治疗糖尿病的关键<sup>[28]</sup>。据研究,与糖尿病相关的菌群有厚壁菌门、梭菌属、罗氏菌属、双歧杆菌、拟杆菌属、乳酸杆菌、肠杆菌和芽孢杆菌等,其中厚壁菌门、梭菌属和罗氏菌属能够降低结肠pH,影响胰岛素抵抗及糖尿病等;拟杆菌属、乳酸杆菌和双歧杆菌与调节血糖、胆固醇,以及维持肠道屏障功能有关;乳酸杆菌、肠杆菌和芽孢杆菌与激活脑-肝脏神经轴调节血糖平衡有关<sup>[29-30]</sup>。肠道微生物可以通过碳水化合物发酵产生对人体有益的短链脂肪酸(SCFA),而缺乏SCFA

与2型糖尿病有关<sup>[31]</sup>。此外,通过调节厚壁菌门/拟杆菌门的比例,也对糖尿病小鼠血糖有一定的改善作用<sup>[32]</sup>。为此,本文检测了db/db小鼠的肠道菌群多样性,发现正常组与给药组中拟杆菌门和厚壁菌门含量与模型组截然相反,与模型组比较,给药组均降低了厚壁菌门/拟杆菌门比率,提高有益菌的相对丰度,证实黄芪VLNs可能通过调节肠道菌群进而改善db/db小鼠血糖。

口服黄芪VLNs可以通过调节肠道菌群降低糖尿病小鼠血糖,这一结论可能与文献报道口服VLNs不能直接吸收入血<sup>[33]</sup>有关,此外,这与TENG等<sup>[34]</sup>发现给结肠炎小鼠口服生姜VLNs,可以调节肠道菌群,完善肠道屏障功能,进而减轻结肠炎的结果一致。但也有研究发现,金银花汤剂中的微小核糖核酸2911(miRNA2911)可以吸收进入体内并自我组装成细胞外囊泡发挥作用<sup>[35-36]</sup>。提示黄芪VLNs除了通过影响肠道菌群降低血糖,还可能通过被胃肠壁吸收内化,其含有的各种成分进行自我组装,再以分泌细胞外囊泡形式“吐出”作用于靶细胞、靶器官,进而调节血糖,但这一结果还有待进一步研究证实。综上分析,本研究初步建立了黄芪VLNs超速离心法富集的新方法,并发现黄芪VLNs可能通过调节肠道菌群降低db/db糖尿病小鼠血糖,表明黄芪VLNs可能是黄芪降糖的新成分,但关于其降糖作用机制及其他药理作用尚需进行更为深入的研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 李珍一,闫承慧,田孝祥,等. 黄芪水提取物对心肌纤维化的拮抗作用研究[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(5): 1058-1060.
- [2] 桑震池,刘宗军. 黄芪对改善心力衰竭的作用及机制研究[J]. 系统医学, 2016, 1(12): 163-165.
- [3] 柴长斌,马茜,周丽,等. 黄芪多糖可提升小鼠巨噬细胞和自然杀伤细胞的抗肿瘤作用[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2019, 39(4): 292-297.
- [4] 李勇森,韩孟伊,陈冰霞,等. 黄芪对小鼠淋巴细胞及其表面分子的调节作用[J]. 免疫学杂志, 2020, 26(1): 52-57.
- [5] GUO Z Z, LOU Y M, KONG M Y, et al. A systematic review of phytochemistry, pharmacology and pharmacokinetics on Astragali Radix: Implications for Astragali Radix as a personalized medicine [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(6): 1463.
- [6] AGYEMANG K, HAN L F, LIU E W, et al. Recent

advances in *Astragalus membranaceus* anti-diabetic research: pharmacological effects of its phytochemical constituents [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013: 654643.

- [7] LI X Y, LIANG Z, DU J C, et al. Herbal decoctosome is a novel form of medicine [J]. Sci China Life Sci, 2019, 62(3): 333-348.
- [8] ZHANG M Z, 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] CAO M, YAN H J, HAN X, et al. Ginseng-derived nanoparticles alter macrophage polarization to inhibit melanoma growth [J]. J Immunother Cancer, 2019, 7(1): 326.
- [10] 高文静,侯敏,王攀,等. 外泌体作为中药新活性成分的研究进展[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2019, 21(9): 1869-1876.
- [11] EDGAR R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. Nat Methods, 2013, 10(10): 996-998.
- [12] STACKEBRANDT E, GOEBEL B M. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology [J]. Intjsystbacteriol, 1994, 44(4): 846-849.
- [13] WANG Q, GARRITY G M, TIEDJE J M, et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy [J]. APPL Environ Microbiol, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [14] JU S W, MU J Y, DOKLAND T, et al. Grape exosome-like nanoparticles induce intestinal stem cells and protect mice from DSS-induced colitis [J]. Mol Ther, 2013, 21(7): 1345-1357.
- [15] WANG Q L, ZHUANG X Y, MU J Y, et al. Delivery of therapeutic agents by nanoparticles made of grapefruit-derived lipids [J]. Nat Commun, 2013, 4: 1867.
- [16] LI P, KASLAN M, LEE S H, et al. Progress in exosome isolation techniques [J]. Theranostics, 2017, 7(3): 789-804.
- [17] MU J Y, ZHUANG X Y, WANG Q L, et al. Interspecies communication between plant and mouse gut host cells through edible plant derived exosome-like nanoparticles [J]. Mol Nutr Food Res, 2014, 58(7): 1561-1573.
- [18] 张亚楠,赵琼玥,岳可心,等. 复方黄芪降糖颗粒对四

- 氧嘧啶致高血糖小鼠的降糖作用研究[J]. 特产研究, 2020, 42(2): 27-31.
- [19] 韩冬. 黄芪甲苷对实验性糖尿病大鼠降糖、调脂和抗氧化作用的研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(4): 360-364.
- [20] 石永芳. 黄芪多糖对II-型糖尿病小鼠血糖的影响[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(29): 29-30, 37.
- [21] ZHENG Y J, REN W Y, ZHANG L N, et al. A review of the pharmacological action of *Astragalus polysaccharide*[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 349.
- [22] 贾旭鸣, 孙云峰, 李楠, 等. 黄芪饮片及提纯有效部位干预糖尿病大鼠的药效学比较研究[J]. 实用中医内科杂志, 2011, 25(8): 16-17, 19-20.
- [23] KAI Z, MICHELA P, ANTONIO P, et al. Biological active ingredients of traditional Chinese herb *Astragalus membranaceus* on treatment of diabetes: A systematic review[J]. Mini Rev Med Chem, 2015, 15(4): 315-329.
- [24] 冯毅, 冯烈. 黄芪对糖尿病大鼠肾脏保护作用的机制[J]. 实用医学杂志, 2006, 22(21): 2457-2459.
- [25] LAESEN N, VOGENSEN F K, VAN DEN BERG F W, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults [J]. PLoS One, 2010, 5(2): e9085.
- [26] SEDIGHI M, RAZAVI S, NAVAB-MOGHADAM F, et al. Comparison of gut microbiota in adult patients with type 2 diabetes and healthy individuals [J]. Microb Pathog, 2017, 111: 362-369.
- [27] WANG Y Y, YE X L, DING D F, et al. Characteristics of the intestinal flora in patients with peripheral neuropathy associated with type 2 diabetes [J]. J Int Med Res, 2020, 48(9): 300060520936806.
- [28] WU H, ESTEVE E, TREMAROLI V, et al. Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naive type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug [J]. Nat Med, 2017, 23(7): 850-858.
- [29] 白宁宁, 张菁, 方启晨. 肠道菌群与糖尿病关系的研究进展[J]. 医学研究杂志, 2017, 46(4): 171-174, 178.
- [30] NICHOLSON J K, HOLMES E, KINROSS J, et al. Host-gut microbiota metabolic interactions [J]. Science, 2012, 336(6086): 1262-1267.
- [31] ZHAO L, ZHANG F, DING X, et al. Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes [J]. Science, 2018, 359(6380): 1151-1156.
- [32] WEI Y, YANG H, ZHU C, et al. Hypoglycemic effect of ginsenoside Rg<sub>3</sub> mediated partly by modulating gut microbiota dysbiosis in diabetic db/db mice [J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(18): 5107-5117.
- [33] 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]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2020, 18: 880-892.
- [34] TENG Y, REN Y, SAYED M, et al. Plant-derived exosomal microRNAs shape the gut microbiota [J]. Cell Host Microbe, 2018, 24(5): 637-652.
- [35] ZHOU Z, LI X H, ZHANG C Y, et al. Honeysuckle-encoded atypical microRNA2911 directly targets influenza A viruses [J]. Cell Res, 2015, 25(1): 39-49.
- [36] ZHOU L K, ZHOU Z, JIANG X M, et al. Absorbed plant MIR2911 in honeysuckle decoction inhibits SARS-CoV-2 replication and accelerates the negative conversion of infected patients [J]. Cell Discov, 2020, 6: 54.

[责任编辑 刘德文]