

菥蓂不同提取物对高尿酸血症小鼠肠道菌群的影响

康希¹, 郝慧汇¹, 穆成林², 卢焘韬², 王雪莲², 唐丽婧², 杨荣平^{2*}

(1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2. 西南大学药学院, 重庆 400715)

[摘要] 目的:探索菥蓂不同提取物对高尿酸血症小鼠肠道菌群的影响,以揭示其降尿酸活性物质基础和作用机制。方法:将88只雄性昆明鼠小鼠分为11组,即空白组,模型组,别嘌呤醇组,石油醚提取物高、低剂量组,乙酸乙酯提取物高、低剂量组,正丁醇提取物高、低剂量组,总黄酮提取物高、低剂量组。空白组小鼠灌胃0.5%羧甲基纤维素钠,其他组小鼠均灌胃氧嗪酸钾(500 mg·kg⁻¹)以复制高尿酸血症模型。造模若干小时后,空白组和模型组均灌胃蒸馏水,别嘌呤醇组给予别嘌呤醇混悬液(50 mg·kg⁻¹)。各给药组按高、低剂量(5, 2.5 g·kg⁻¹)灌胃给药,每日1次,持续14 d后取血,测定血尿酸(SUA)水平和黄嘌呤氧化酶(XOD)活性,收集新鲜粪便进行16S rDNA测序。结果:与空白组比较,模型组SUA水平和XOD活性明显升高($P<0.05$);与模型组相比,别嘌呤醇组SUA水平和XOD活性显著下降($P<0.01$),菥蓂给药组干预后,除石油醚提取物高、低剂量组和总黄酮提取物低剂量组外,SUA水平均明显降低($P<0.05, P<0.01$),石油醚提取物低剂量组、总黄酮提取物高剂量组和正丁醇提取物高、低剂量组可明显抑制XOD活性($P<0.05, P<0.01$),其中总黄酮提取物高剂量组降低SUA水平和抑制XOD活性最显著。菌群测序结果显示,模型组 α 多样性和菌群丰度变化显著,且发现拟杆菌门(Bacteroidetes),厚壁菌门(Firmicutes)和乳酸杆菌科(Lactobacillaceae)与XOD活性显著相关;给药组干预后菥蓂总黄酮提取物高、低剂量组操作分类单元(OTU), ACE, Chao1, Shannon指数明显升高($P<0.05, P<0.01$);乙酸乙酯提取物低剂量组、总黄酮提取物高剂量组和正丁醇提取物高、低剂量组的拟杆菌门相对丰度显著降低($P<0.01$),厚壁菌门相对丰度显著升高($P<0.01$);乳酸杆菌科相对丰度在正丁醇提取物低剂量组、总黄酮提取物高剂量组中显著升高($P<0.01$)。结论:菥蓂降尿酸的有效部位主要为黄酮类成分,通过影响肠道菌群如乳酸杆菌、拟杆菌和厚壁菌进而改善机体SUA水平和XOD活性可能是其作用机制之一。

[关键词] 菥蓂; 高尿酸血症; 肠道菌群; 黄嘌呤氧化酶(XOD); 黄酮类

[中图分类号] R22;R378.2;R28;R696+6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)17-0132-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211249

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210324.1402.001.html>

[网络出版日期] 2021-03-25 16:45

Effect of Different Extracts of Thlaspi Herba on Gut Microbiota of Hyperuricemia Mice

KANG Xi¹, HAO Hui-hui¹, MU Cheng-lin², LU Tao-tao², WANG Xue-lian²,

TANG Li-jing², YANG Rong-ping^{2*}

(1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;

2. College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of different extracts of Thlaspi Herba on the gut microbiota of hyperuricemia mice, and to reveal the substance basis and mechanism of its hypouricemic activity. **Method:** Eighty-eight male Kunming mice were divided into 11 groups, including blank group, model group, allopurinol group, high and low dose groups of petroleum ether extract, high and low dose groups of ethyl acetate extract, high and low dose groups of *n*-butanol extract, high and low dose groups of total flavonoids extract. Mice in the blank group were given 0.5% sodium carboxymethylcellulose by gavage, and the other groups were given oteracil potassium (500 mg·kg⁻¹) by gavage to duplicate the hyperuricemia model. After modeling for several

[收稿日期] 20201224(011)

[第一作者] 康希, 硕士, 从事中药新剂型、新技术研究, Tel: 023-89029068, E-mail: 2960985979@qq.com

[通信作者] * 杨荣平, 博士, 教授, 从事中药新制剂、新剂型及新技术与应用研究, Tel: 023-89029068, E-mail: yangrp@cqacmm.com

hours, the blank group and the model group were given distilled water by gavage, while mice in the allopurinol group were given allopurinol suspension ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), and mice in each treatment group were given high and low doses of corresponding extract ($5, 2.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). The serum uric acid (SUA) level and xanthine oxidase (XOD) activity were measured after 14 days. Fresh feces were collected for 16S rDNA sequencing. **Result:** Compared with the blank group, SUA level and XOD activity of model group were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, SUA level and XOD activity of the allopurinol group were significantly decreased ($P < 0.01$). After intervention, SUA level were significantly decreased ($P < 0.05, P < 0.01$), except for high dose and low dose groups of petroleum ether extract and low dose group of total flavonoids extract, XOD activity was significantly inhibited in low dose group of petroleum ether extract, high dose group of total flavonoids extract, and high and low dose groups of *n*-butanol extract ($P < 0.05, P < 0.01$). The high dose group of total flavonoids extract was the most significant. The results of flora sequencing showed that α diversity and abundance of the model group changed significantly, and Bacteroidetes, Firmicutes and Lactobacillaceae were significantly correlated with XOD activity. After intervention, the operational taxonomic unit (OTU), ACE, Chao1 and Shannon indexes of the high and low dose groups of total flavonoids extract were significantly increased ($P < 0.05, P < 0.01$). Relative abundance of Bacteroidetes in low dose group of ethyl acetate extract, high dose group of total flavonoids extract, and high and low dose groups of *n*-butanol extract was significantly decreased ($P < 0.01$), and the relative abundance of Firmicutes was significantly increased ($P < 0.01$). The relative abundance of Lactobacillaceae in low dose group of *n*-butanol extract and high dose group of total flavonoids extract was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** The effective part of *Thlaspi Herba* for reducing uric acid is mainly flavonoids, the improvement of SUA level and XOD activity by affecting gut microbiota such as Lactobacillaceae, Bacteroidetes and Firmicutes, may be one of its mechanisms.

[Keywords] *Thlaspi Herba*; hyperuricemia; gut microbiota; xanthine oxidase (XOD); flavonoids

据统计,中国高尿酸血症总体患病率13.3%^[1],是糖尿病、心血管疾病、慢性肾脏病及脑卒中的独立危险因素^[2-5]。尿酸盐水平过饱和导致尿酸单钠盐结晶的形成,是痛风发病的核心^[6]。近年来研究发现肠道菌群结构变化与高尿酸血症关系密切^[7-9],为高尿酸血症及痛风的治疗提供了新思路。

菥蓂能清肝明目、和中利湿、解毒消肿,民间常当作茶饮以防治痛风。目前,有关菥蓂的研究主要围绕其化学成分、质量标准及体外抗炎、抗氧化作用,对于其他药效作用的探索较少。本课题组前期研究表明,菥蓂具有降尿酸、抑制黄嘌呤氧化酶(XOD)活性的作用^[10-11],但相关物质基础和作用机制不明确。基于此,本实验采用氧嗪酸钾制备高尿酸血症小鼠模型,利用16S rDNA高通量测序技术分析高尿酸血症小鼠肠道菌群多样性和结构,研究菥蓂不同部位提取物对高尿酸血症小鼠血清尿酸(SUA),XOD活性及肠道菌群多样性和结构的影响,并分析其相关性,探索菥蓂降尿酸的活性部位,从肠道微生物的角度揭示其作用机制,为菥蓂降尿酸新药的研发提供实验依据。

1 材料

Synergy H1型多功能微孔板检测仪(美国伯腾仪器有限公司),BK-400型分立式全自动生化分析仪(济南鑫贝西生物技术有限公司),TGL-16G型高速离心机(上海安亭科学仪器厂)。菥蓂购于重庆储奇门药材市场,经重庆市中药研究院生药所秦松云副研究员鉴定为十字花科植物菥蓂 *Thlaspi arvense* 的干燥地上部分;芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号100080-201610,纯度92.6%),氧嗪酸钾(德国Ruibio公司,批号Y02733),别嘌醇片(合肥久联制药有限公司,批号20181204),尿酸(UA)检测试剂盒(山东博科生物产业有限公司,批号00421025Y),XOD检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号20200708),HPD722型大孔树脂(郑州和成新材料科技有限公司,批号HC200923)。

SPF级昆明种小鼠共88只,雄性,体质量(20 ± 2)g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2019-0010。实验期间小鼠自由饮食饮水,适应性饲养1周后进行相关实验。本文所涉及动物实验经西南大学实验动物伦理委员会批准,批准编号xy202109。

2 方法

2.1 菥蓂不同提取物的制备 取菥蓂药材 50 g,加 10 倍量 95% 乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,合并滤液,减压回收乙醇,于 50 °C 真空干燥 48 h,得到浸膏 1.34 g。浸膏加水混悬至 50 mL,按 1:1 比例加入石油醚(60~90 °C),乙酸乙酯,水饱和正丁醇依次萃取,萃取至无色再进行下一步萃取,减压回收溶剂,于 50 °C 真空干燥,得各萃取部位,将各部位分别加水超声使溶解(350 W, 60 kHz, 120 min),加蒸馏水混悬定容至 50 mL,冷藏备用。

2.2 菥蓂总黄酮的制备^[12] 取菥蓂药材 50 g,加入 13 倍量 50% 乙醇回流提取 3 h,提取液减压回收,于 50 °C 真空干燥 48 h,得干浸膏 3.64 g,加水使溶解,以 1.3 mL·min⁻¹ 流速通过预处理好的 HPD722 型大孔树脂进行吸附,吸附完成后水洗,最后用 70% 乙醇洗脱,洗脱流速 3 mL·min⁻¹,收集洗脱液减压回收溶剂,得总黄酮提取液 50 mL。质量控制以芦丁的甲醇溶液作对照,采用 AlCl₃ 显色法测定,计算菥蓂药材中总黄酮质量分数 15.05 mg·g⁻¹。

2.3 动物分组及给药 小鼠随机分组,每组 8 只,包括空白组,模型组,别嘌呤醇组,石油醚提取物高、低剂量组,乙酸乙酯提取物高、低剂量组,正丁醇提取物高、低剂量组,总黄酮提取物高、低剂量组。别嘌呤醇和氧嗪酸钾均混悬于 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)中。每日上午除空白组灌胃 0.5% CMC-Na 外,其他组均灌胃氧嗪酸钾混悬液(500 mg·kg⁻¹)^[13],造模若干小时后,空白组和模型组灌胃给予相应体积蒸馏水,别嘌呤醇组给予别嘌呤醇混悬液(50 mg·kg⁻¹),各给药组按高、低剂量(5, 2.5 g·kg⁻¹,剂量根据体表面积换算法及预试验确定,按生药量计)灌胃给药,持续 14 d。

2.4 样本采集 在药物干预 13 d 后,无菌操作台取小鼠新鲜粪便装入无菌离心管中,置于冰盒,采集完毕立即放入 -80 °C 冰箱,干冰送检。取血前小鼠禁食不禁水,最后 1 次给药后 1 h,小鼠眼球取血,血液室温静置 2 h,3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min(离心半径 4.1 cm),吸取上层血清待测。

2.5 血清 SUA, XOD 水平检测 使用全自动生化仪检测 SUA 水平,按说明书检测血清 XOD 水平。

2.6 16S rDNA 测序分析高尿酸血症小鼠肠道菌群变化 微生物多样性是提取样品总 DNA 后,基于 Illumina HiSeq 平台,利用双末端测序(paired-end)的方法,构建小片段文库进行测序。通过对测序序列 reads 拼接过滤,得到优化序列。使用 Usearch

10.0 软件对优化序列在 97% 的相似度水平下进行聚类获得操作分类单元(OTU),并基于 Silva 数据库对 OTU 进行分类学注释。进而在门、纲、目、科、属、种分类学水平上统计各样品群落组成;进一步使用 Mothur 1.30 软件,对 α 多样性指数进行分析评估;使用 QIIME 1 软件进行 β 多样性分析,比较不同样品在物种多样性方面的相似程度。

2.7 统计学分析 应用 SPSS 25.0 软件对实验数据进行差异分析,计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,运用最小显著性差异法(LSD)进行组间多重比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义;相关性分析采用 Pearson 相关性分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 菥蓂提取物对高尿酸血症小鼠 SUA 和 XOD 活性的影响 与空白组比较,模型组 SUA 水平和 XOD 活性明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,别嘌呤醇组能显著降低 SUA 水平,抑制 XOD 活性($P < 0.01$)。大部分给药组可不同程度地降低 SUA 水平、抑制 XOD 活性;其中,乙酸乙酯提取物高、低剂量组,正丁醇提取物高、低剂量组及总黄酮提取物高剂量组能明显降低 SUA 水平($P < 0.05$, $P < 0.01$);石油醚提取物低剂量组,正丁醇提取物高、低剂量组及总黄酮提取物高剂量组有明显抑制 XOD 活性的作用($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 1。

表 1 不同菥蓂提取物对 SUA 水平和 XOD 活性的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 1 Effect of Thlaspi Herba extracts on SUA level and XOD activity ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SUA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	XOD/U·L ⁻¹
空白		86.67 \pm 25.15	12.52 \pm 0.91
模型		122.00 \pm 30.06 ¹⁾	15.48 \pm 2.88 ¹⁾
别嘌呤醇	0.05	24.75 \pm 0.96 ⁴⁾	9.80 \pm 0.28 ⁴⁾
石油醚提取物	5.0	107.33 \pm 27.10	16.07 \pm 2.29
	2.5	103.00 \pm 36.04	12.32 \pm 1.32 ³⁾
乙酸乙酯提取物	5.0	81.40 \pm 8.11 ⁴⁾	13.99 \pm 2.39
	2.5	85.00 \pm 22.88 ³⁾	13.34 \pm 1.26
正丁醇提取物	5.0	70.67 \pm 14.57 ⁴⁾	12.20 \pm 2.51 ³⁾
	2.5	90.50 \pm 5.97 ³⁾	11.68 \pm 0.66 ⁴⁾
总黄酮提取物	5.0	19.25 \pm 13.50 ⁴⁾	10.76 \pm 0.89 ⁴⁾
	2.5	104.75 \pm 27.46	15.15 \pm 1.17

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2, 3 同)。

3.2 测序质控分析 将高尿酸血症小鼠的新鲜粪便样本进行 16S rDNA 序列 V3-V4 区扩增后测序,

平均产生 78 832 条优化序列,数据量达标;从样本中随机抽取一定数量的序列,以序列数与物种数构建稀释性曲线,验证测序数据量是否足以反映样品中的物种多样性。由图 1(B)可知,稀释曲线在一定范围内,随着测序条数的加大,曲线急剧上升,表示群落中有大量物种被发现,之后曲线趋于平缓,表示此环境中的物种并不会随测序数量的增加而显著增多。表明样品序列充分,可以进行数据分析。依据各样品的测序量在不同测序深度时的 Shannon 指数,绘制 Shannon 曲线,以此反映各样本在不同测序数量时的微生物多样性。图 1(A)的曲线趋向平坦,说明测序数据量足够大,物种饱和。

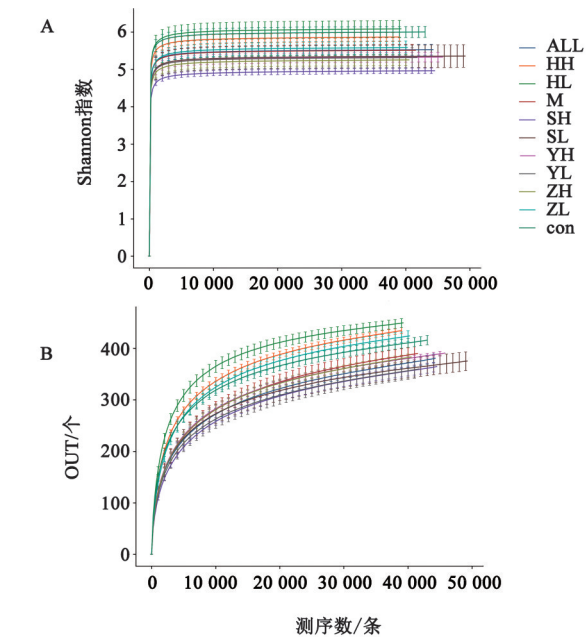
3.3 菝葜提取物对高尿酸血症小鼠肠道菌群 α 多样性的影响 α 多样性反映的是单个样品物种丰度及物种多样性,有多重衡量指标(Chao1, ACE, Shannon 和 Simpson)。Chao1 和 ACE 指数衡量物种丰度即物种数量的多少,Shannon 和 Simpson 指数用于衡量物种多样性,Shannon 指数越大,Simpson 指数越小,说明样品的物种多样性越高。与空白组比较,模型组 Chao1 指数和 Shannon 指数显著降低,Simpson 指数明显升高($P<0.05$),ACE 指数降低但不具有统计学差异,说明模型组小鼠肠道菌群丰度与多样性均下降。与模型组比较,正丁醇提取物低剂量组和总黄酮提取物高、低剂量组 OTU 数量,ACE 指数,Chao1 指数明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。

表 2 不同菝葜提取物对高尿酸血症小鼠肠道菌群 α 多样性的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Effect of Thlaspi Herba extracts on α diversity of gut microbiota in hyperuricemia mice ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	OTU/个	ACE	Chao1	Simpson	Shannon
空白		422.40 \pm 17.29	454.42 \pm 15.58	462.15 \pm 21.42	0.032 \pm 0.004	4.16 \pm 0.23
模型		393.67 \pm 19.30 ¹⁾	442.27 \pm 25.67	431.21 \pm 23.38 ¹⁾	0.056 \pm 0.016 ¹⁾	3.73 \pm 0.13 ¹⁾
别嘌呤醇	0.05	386.00 \pm 18.30	431.83 \pm 18.64	437.43 \pm 19.78	0.054 \pm 0.014	3.83 \pm 0.22
石油醚提取物	5.0	376.80 \pm 16.72	421.33 \pm 12.68	435.14 \pm 12.23	0.088 \pm 0.012 ³⁾	3.45 \pm 0.11
	2.5	372.25 \pm 34.01	417.87 \pm 28.07	421.82 \pm 29.26	0.122 \pm 0.029 ⁴⁾	3.72 \pm 0.47
乙酸乙酯提取物	5.0	400.75 \pm 6.13	437.73 \pm 11.38	455.45 \pm 11.40	0.077 \pm 0.022	3.70 \pm 0.20
	2.5	378.80 \pm 28.10	420.93 \pm 23.88	427.24 \pm 31.87	0.071 \pm 0.025	3.69 \pm 0.41
正丁醇提取物	5.0	391.40 \pm 11.52	429.92 \pm 13.92	441.34 \pm 24.65	0.070 \pm 0.020	3.64 \pm 0.23
	2.5	437.60 \pm 17.62 ⁴⁾	472.65 \pm 16.05 ³⁾	477.27 \pm 15.89 ⁴⁾	0.075 \pm 0.008	3.88 \pm 0.27
总黄酮提取物	5.0	444.00 \pm 11.11 ⁴⁾	476.38 \pm 13.79 ⁴⁾	484.49 \pm 15.38 ⁴⁾	0.039 \pm 0.009	4.14 \pm 0.12 ³⁾
	2.5	453.60 \pm 18.51 ⁴⁾	473.67 \pm 14.16 ³⁾	478.89 \pm 11.98 ⁴⁾	0.032 \pm 0.006 ³⁾	4.22 \pm 0.35 ³⁾

3.4 菝葜提取物对高尿酸血症小鼠肠道菌群 β 多样性的影响 热图是基于距离算法得到样品间的距离矩阵,通过 R 语言工具绘制样品热图,颜色梯度由蓝色到红色表示样品间距离由近到远,距离越近



con. 空白组; M. 模型组; ALL. 别嘌呤醇组; SH. 石油醚提取物高剂量组; SL. 石油醚提取物低剂量组; YH. 乙酸乙酯提取物高剂量组; YL. 乙酸乙酯提取物低剂量组; ZH. 正丁醇提取物高剂量组; ZL. 正丁醇提取物低剂量组; HH. 总黄酮提取物高剂量组; HL. 总黄酮提取物低剂量组(图 2, 3 和表 3 同); A. Shannon 曲线; B. 稀释性曲线

图 1 高尿酸血症小鼠肠道菌群测序

Fig. 1 Sequencing of gut microbiota in hyperuricemia mice

总黄酮提取物高、低剂量组 Shannon 指数明显升高($P<0.05$),总黄酮提取物低剂量组 Simpson 指数明显降低($P<0.05$)。见表 2。

说明样品越相似。空白组与模型组距离较远;模型组与正丁醇提取物低剂量组及总黄酮提取物高、低剂量组距离较远,相似度较低,说明药物干预后,群落物种的构成有明显变化。见图 2。

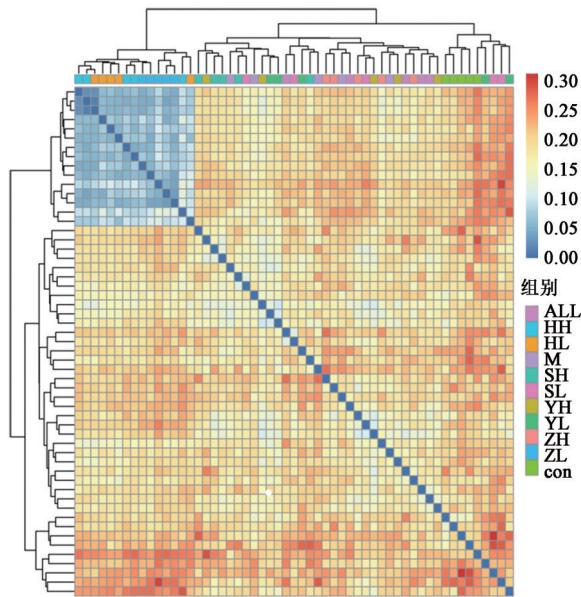
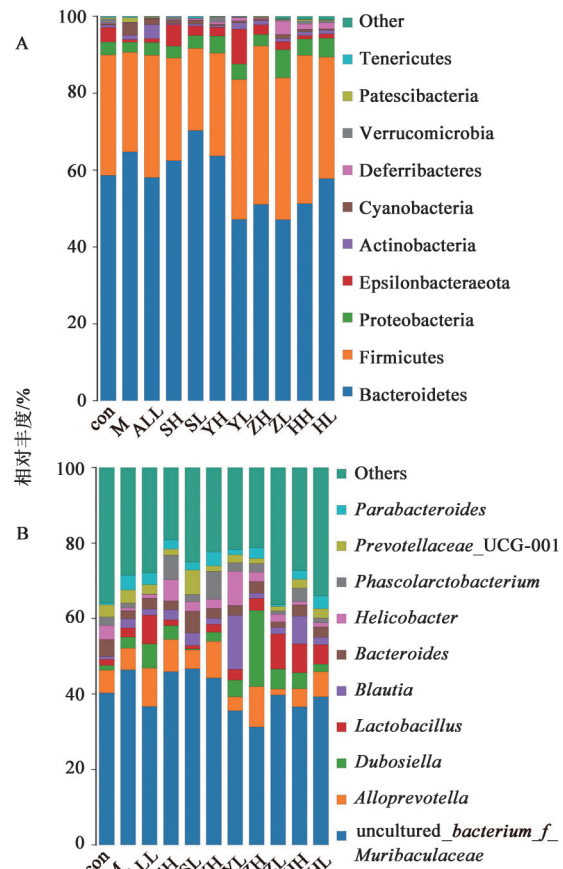


图2 高尿酸血症小鼠肠道菌群β多样性热图分析
Fig. 2 Heatmap of β diversity of gut flora in hyperuricemia mice

3.5 菌群结构与组成分析 肠道菌群物种分布柱状图见图3。图中显示了各组丰度前10位的物种，并将其他物种合并为others。Unclassified代表未得到分类学注释的物种。在门水平，与空白组比较，模型组、别嘌呤醇组物种多样性水平降低，给药组多样性有不同程度的增加；主要由拟杆菌门(Bacteroidetes)，厚壁菌门(Firmicutes)，变形菌门(Proteobacteria)，Epsilonbacteraeota，放线菌门(Actinobacteria)，蓝细菌门(Cyanobacteria)，柔膜菌门(Tenericutes)等组成。在属水平，模型组多样性与空白组对比无显著变化；与空白组比较，别嘌呤醇组考拉杆菌属(*Phascolarctobacterium*)丰度极低，石油醚提取物低剂量组 *Dubosiella* 相对丰度极低。

表3为菌群丰度显著变化的菌群。门水平上，变化显著的有拟杆菌门、厚壁菌门、蓝细菌门。与空白组比较，模型组的拟杆菌门、蓝细菌门相对丰度明显升高($P<0.05$)，厚壁菌门明显降低($P<0.05$)。与模型组比较，乙酸乙酯提取物低剂量组、正丁醇提取物高、低剂量组、总黄酮提取物高剂量组能显著降低拟杆菌门相对丰度($P<0.01$)和升高厚壁菌门相对丰度($P<0.01$)；各给药组均能明显降低蓝细菌门相对丰度($P<0.05$, $P<0.01$)。科水平上，与空白组比较，模型组毛螺菌科(Lachnospiraceae)相对丰度显著降低($P<0.01$)，Muribaculaceae升高、乳酸杆菌科(Lactobacillaceae)降低，但差异无统计学意义。与模型组比较，乙酸乙酯提取物低剂量组、正丁醇提取物低剂量组、总黄酮提取物高剂量组能明显升



A. 门水平; B. 属水平
图3 高尿酸血症小鼠肠道菌群物种多样性分布
Fig. 3 Distribution of species diversity of gut microbiota in hyperuricemia mice

高毛螺菌科相对丰度($P<0.05$, $P<0.01$)，别嘌呤醇组、乙酸乙酯提取物低剂量组、正丁醇提取物高剂量组、总黄酮提取物高剂量组 Muribaculaceae 相对丰度明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)；别嘌呤醇组、正丁醇提取物低剂量组、总黄酮提取物高剂量组乳酸杆菌科相对丰度明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。属水平上，与空白组比较，模型组螺杆菌属(*Helicobacter*)和考拉杆菌属相对丰度显著降低、副拟杆菌属(*Parabacteroides*)相对丰度明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)，*Prevotellaceae*-UCG-001 相对丰度升高，但差异无统计学意义；与模型组比较，乙酸乙酯提取物低剂量组螺杆菌属相对丰度显著升高($P<0.01$)，石油醚提取物高剂量组、乙酸乙酯提取物高剂量组能显著升高考拉杆菌属相对丰度($P<0.01$)，石油醚提取物高剂量组、乙酸乙酯提取物高剂量组和正丁醇提取物高、低剂量组明显降低 *Prevotellaceae*-UCG-001 丰度($P<0.05$)，石油醚提取物高、低剂量组、乙酸乙酯提取物低剂量组、正丁醇提取物低剂量组能明显降低副拟杆菌属相对丰度($P<0.05$, $P<0.01$)。

表3 肠道菌群在不同组别的相对丰度($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Relative abundance of gut microbiota in each group ($\bar{x}\pm s, n=8$) %

菌群	con	M	ALL	SH	SL	YH	YL	ZH	ZL	HH	HL
拟杆菌门	55.8±5.1	64.4±4.4 ¹⁾	58.0±5.3	65.4±1.6	70.2±4.6	63.5±7.1	47.0±4.0 ⁴⁾	50.8±7.6 ⁴⁾	46.5±10.2 ⁴⁾	48.6±1.5 ⁴⁾	57.7±8.1
厚壁菌门	34.1±7.3	26.0±4.2 ¹⁾	31.8±6.0	26.9±4.1	21.4±3.2	26.9±6.0	36.8±4.4 ⁴⁾	41.3±5.2 ⁴⁾	37.9±11.5 ⁴⁾	38.6±4.2 ⁴⁾	31.6±4.8
蓝细菌门	0.3±0.2	5.3±1.9 ¹⁾	0.9±1.0 ³⁾	0.6±0.2 ³⁾	1.0±0.7 ⁴⁾	0.5±0.3 ³⁾	0.3±0.2 ³⁾	0.7±0.6 ⁴⁾	1.0±0.7 ⁴⁾	0.7±0.4 ³⁾	0.4±0.1 ³⁾
Muribaculaceae	41.0±5.6	47.3±8.0	37.1±7.5 ³⁾	46.8±4.7	47.4±7.5	45.1±2.4	36.3±3.0 ⁴⁾	31.8±4.5 ⁴⁾	40.1±9.4	37.3±6.5 ³⁾	40.3±7.4
毛螺菌科	20.3±8.2	6.0±1.5 ²⁾	9.8±5.4	7.1±3.7	8.5±1.6	7.7±2.2	17.9±4.4 ⁴⁾	4.5±2.3	12.4±6.1 ³⁾	15.2±6.3 ⁴⁾	11.8±7.6
乳酸杆菌科	2.4±0.6	2.0±1.6	7.7±6.8 ³⁾	1.5±1.1	0.9±0.3	2.5±0.2	3.0±2.4	3.2±1.8	9.9±4.6 ⁴⁾	8.5±4.2 ⁴⁾	5.1±0.9
螺杆菌属	4.5±3.6	0.9±1.0 ¹⁾	1.0±0.9	0.4±0.1	2.4±2.4	1.6±0.0	8.6±5.3 ⁴⁾	0.4±0.1	0.9±0.6	0.9±0.8	1.1±0.9
考拉杆菌属	3.6±2.7	0.6±0.7 ¹⁾	0.1±0.0	6.5±2.0 ⁴⁾	0.6±0.1	7.6±2.6 ⁴⁾	0.3±0.2	2.3±2.9	0.2±0.0	1.7±2.3	0.2±0.0
<i>Prevotellaceae</i> -UCG-001	3.2±1.2	3.9±1.9	2.5±0.9	1.5±0.6 ³⁾	6.6±4.1	1.5±0.7 ³⁾	2.0±0.9	1.3±0.8 ³⁾	1.2±0.7 ³⁾	2.3±0.8	2.4±0.8
副拟杆菌属	0.4±0.3	4.3±3.4 ²⁾	3.1±1.4	2.0±0.3 ³⁾	2.1±0.6 ³⁾	3.6±1.6	1.1±0.4 ⁴⁾	2.9±2.5	0.5±0.5 ⁴⁾	2.3±1.4	3.4±1.4

3.6 高尿酸血症小鼠肠道菌群与SUA水平及XOD活性的相关性 将门、科、属水平相对丰度相差较大的菌群与SUA水平及XOD活性进行Pearson相关性分析。结果发现在门水平, 柔膜菌门与SUA水平呈正相关($r=0.394, P<0.01$), 拟杆菌门与血清XOD活性呈正相关($r=0.383, P<0.01$), 厚壁菌门与血清XOD活性呈负相关($r=-0.413, P<0.01$), 放线菌门与血清XOD活性呈负相关($r=-0.325, P<0.05$); 在科水平, Muribaculaceae($r=0.477, P<0.001$)和氨基酸球菌科(Acidaminococcaceae)($r=0.393, P<0.01$)与血清XOD活性呈正相关, 乳酸杆菌科与血清XOD活性呈负相关($r=-0.442, P<0.01$); 在属水平, *Prevotellaceae*-UCG-001与SUA水平呈正相关($r=0.388, P<0.05$), 乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)与血清XOD活性呈负相关($r=-0.364, P<0.05$), 考拉杆菌属与血清XOD活性呈正相关($r=0.557, P<0.001$)。提示部分肠道菌群可能是通过丰度变化影响XOD活性或者直接影响SUA来发挥降UA作用。比较空白组与模型组差异显著的菌群, 以及Pearson相关性分析结果可知, 拟杆菌门、厚壁菌门、乳酸杆菌科可能与高尿酸血症显著相关, 蒜薹正丁醇提取物低剂量组、总黄酮提取物高剂量组对以上菌群均有显著影响, 正丁醇提取物高剂量组、乙酸乙酯提取物低剂量组对拟杆菌门及厚壁菌门有显著影响, 别嘌呤醇组对乳酸杆菌科影响显著。

4 讨论

痛风的发病主要是由于嘌呤类物质代谢紊乱, 使UA生成过多和(或)排泄减少, 而人体缺乏尿酸酶, 不能将尿酸氧化为尿酸素排出体外^[14], SUA浓度持续升高导致尿酸盐沉积关节的代谢性疾病^[15]。

UA水平升高是痛风的生化基础, XOD可催化嘌呤代谢生成UA, 抑制其活性能有效降低UA水平^[16]。故本研究以XOD活性和SUA水平为指标, 探索蒜薹不同提取物对高尿酸血症的影响, 发现经蒜薹不同提取物干预后, 能不同程度地抑制XOD活性、降低SUA水平, 尤以总黄酮提取物高剂量组作用最优; 但不同部位的作用差异较大, 可能由化学成分的交叉或不同导致。此外, 还发现, 蒜薹不同提取物降UA作用与抑制XOD活性之间并非单纯的正相关关系, 提示蒜薹还有其他的降UA作用靶点。

由于人体1/3的尿酸随粪便排出或经肠道菌群进一步分解代谢^[17]。故本研究进一步从肠道菌群角度探讨了蒜薹不同提取物降UA的作用机制。结果表明小鼠的肠道菌群存在明显变化, 模型组物种多样性降低, 且门水平的拟杆菌门显著升高, 厚壁菌门显著降低, 与文献报道一致^[18]。多种菌群与SUA水平及XOD活性显著相关, 如GUO等^[19]发现在痛风患者与健康人之间差异分布的细菌属中, 拟杆菌属与痛风呈正相关, 与本文拟杆菌门与XOD活性呈正相关结果相互印证。厚壁菌门与XOD活性呈负相关, 目前相关报道较少。长期暴露于蓝细菌产生的神经毒素可引发肌萎缩侧索硬化症^[20], 但也有研究报道蓝细菌可显著降低糖尿病大鼠的脂质过氧化^[21], 本文研究发现蓝细菌门在各给药组均显著降低, 但尚不能推测其与高尿酸血症之间的相关性。乳酸杆菌中尿酸酶、尿酸素酶和尿酸酶合成旺盛, 这3种酶可依次将UA降解为5-羟基异尿酸盐、尿酸素、尿酸酸盐, 终产物为尿素。研究发现, 乳酸杆菌能降低SUA^[22]水平和XOD^[23]活性, 进而改善高尿酸血症和痛风, 并于干预后^[24]。本研究中

乳酸杆菌科、乳酸杆菌属均与XOD活性呈负相关。综合分析本文研究结果,发现拟杆菌门、厚壁菌门、乳酸杆菌科可能与高尿酸血症显著相关。

综上所述,本研究发现除石油醚提取物高、低剂量组和总黄酮提取物低剂量组外,其他蒺藜给药组均有较好的降UA作用,其中总黄酮提取物高剂量组和别嘌呤醇组效果最显著。提示蒺藜降UA的有效部位为黄酮类,通过影响肠道菌群如乳酸杆菌、拟杆菌和厚壁菌进而改善机体SUA和XOD水平可能是其作用机制之一。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] LIU R, HAN C, WU D, et al. Prevalence of hyperuricemia and gout in mainland China from 2000 to 2014: a systematic review and Meta-analysis [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 762812-762820.

[2] GARCÍA-ARROYO F E, GONZAGA G, MUÑOZ-JIMÉNEZ I, et al. Probiotic supplements prevented oxonic acid-induced hyperuricemia and renal damage [J]. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0202901.

[3] ZUO T, LIU X H, JIANG L, et al. Hyperuricemia and coronary heart disease mortality: a Meta-analysis of prospective cohort studies [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2016, 16: 207.

[4] TANG W, FU Q, ZHANG Q Q, et al. The association between serum uric acid and residual β -cell function in type 2 diabetes [J]. *J Diabetes Res*, 2014, 2014: 709691.

[5] KANBAY M, SOLAK Y, DOGAN E, et al. Uric acid in hypertension and renal disease: the chicken or the egg? [J]. *Blood Purificat*, 2010, 30(4): 288-295.

[6] MAJOR T J, DALBETH N, STAHL E A, et al. An update on the genetics of hyperuricaemia and gout [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2018, 14(6): 341-353.

[7] 黄胜男,林志健,张冰,等. 肠道菌群结构变化与高尿酸血症发生的关系[J]. *北京中医药大学学报*, 2015, 38(7): 452-456.

[8] 李君霞,王茂杰,黄闰月,等. 痛风肠道微生态研究现状与思考[J]. *免疫学杂志*, 2018, 34(11): 1008-1012.

[9] 金钊,徐明智. 肠道菌群与高尿酸血症及痛风的相关性研究[J]. *中国微生态学杂志*, 2019, 31(8): 980-984.

[10] 柯秀梅,杨荣平,王云红,等. 藏药蒺藜中黑芥子苷对黄嘌呤致小鼠高尿酸作用的研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2015, 27(8): 1407-1410.

[11] 于金英. 复方蒺藜胶囊治疗痛风的药学研究[D]. 成

都:成都中医药大学,2015.

[12] 马荣镛. 大孔树脂纯化蒺藜水提物黄酮的研究[D]. 南宁:广西大学,2012.

[13] 曾金祥,毕莹,许兵兵,等. 车前子提取物部位群抗痛风的作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(8): 132-135.

[14] 李醒,褚夫江,蒋诗林,等. 桑黄乙醇提取物对大鼠尿酸代谢及肠道微生物影响的初步研究[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(1): 177-182.

[15] 魏蔼玲,袁明昊,刘娟汝,等. 中药在痛风疾病中的应用及其作用机制研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(19): 225-234.

[16] 任玲玲,张迟,曾金祥,等. 降尿酸中药药效物质筛选方法学研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(18): 227-234.

[17] HOSOMI A, NAKANISHI T, FUJITA T, et al. Extra-renal elimination of uric acid via intestinal efflux transporter BCRP/ABCG2 [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30456.

[18] YU Y R, LIU Q P, LI H C, et al. Alterations of the gut microbiome associated with the treatment of hyperuricaemia in male rats [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2233.

[19] GUO Z, ZHANG J C, WANG Z L, et al. Intestinal microbiota distinguish gout patients from healthy humans [J]. *Sci Rep-UK*, 2016, 6: 20602.

[20] CALLER T A, DOOLIN J W, HANEY J F, et al. A cluster of amyotrophic lateral sclerosis in New Hampshire: a possible role for toxic Cyanobacteria blooms [J]. *Amyotroph Lateral Scler*, 2009, 10 (Suppl2): 101-108.

[21] PANDURANGAN M, KIM D H. Therapeutic potential of Cyanobacteria against streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *3 Biotech*, 2016, 6(1): 94.

[22] YAMANAKA H, TANIGUCHI A, TSUBOI H, et al. Hypouricaemic effects of yoghurt containing *Lactobacillus gasseri* PA-3 in patients with hyperuricaemia and/or gout: a randomised, double-blind, placebo-controlled study [J]. *Mod Rheumatol*, 2019, 29(1): 146-150.

[23] WANG H N, MEI L, DENG Y, et al. *Lactobacillus brevis* DM9218 ameliorates fructose-induced hyperuricemia through inosine degradation and manipulation of intestinal dysbiosis [J]. *Nutrition*, 2019, 62: 63-73.

[24] 邓英. 乳杆菌对高果糖诱导小鼠高尿酸血症的防治作用及机制探讨[D]. 大连:大连医科大学,2018.

[责任编辑 刘德文]