

· 药理 ·

糖耐康对 T2DM 大鼠 ZDF 肠道菌群结构的影响

吴莉娟¹, 孙文², 吴丽丽², 秦灵灵³, 高健⁴, 穆晓红⁵, 刘铜华^{6*}

(1. 成都中医药大学 临床医学院, 成都 610072; 2. 北京中医药大学 中医养生所, 北京 100029;
3. 北京中医药大学 科技处, 北京 100029; 4. 对外经济贸易大学 信息学院, 北京 100029;
5. 北京中医药大学 东直门医院, 北京 100700; 6. 北京中医药大学 研究生院, 北京 100029)

[摘要] 目的:研究自发性2型糖尿病(T2DM)大鼠ZDF(Zucker diabetic fatty)(fa/fa)与ZDF(fa/+)及经糖耐康干预后,ZDF(fa/fa)肠道共生细菌菌群结构的变化。方法:将6只雄性ZDF(fa/+)大鼠设为正常组,雄性ZDF(fa/fa)大鼠18只(不同日随机血糖均值 $\geq 11.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)设为T2DM成模组。根据体重及随机血糖(RBG)随机分为3组,分别为模型组(生理盐水 $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$),糖耐康高、低剂量(糖耐康 $3.24, 0.81 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,每组6只。给药6周后取材,腹主动脉取血检测大鼠空腹血糖(FPG)及空腹血清胰岛素(FINS);收集大鼠肠道内粪便,行逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR),通过扩增子焦磷酸测序分析16S rRNA V4区菌群的变化。结果:与模型组比较,糖耐康高、低剂量组大鼠FPG, FINS有显著改善($P < 0.01$)。各组大鼠在菌群丰度多样性及结构组成上有显著差异。在科及以下水平上,与正常组比较,模型组乳酸杆菌明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,糖耐康高、低剂量组乳酸杆菌丰度有所下降,但无统计学差异,普雷沃氏菌丰度显著升高($P < 0.01$),且普雷沃氏菌属与ZDF大鼠FINS呈正相关。结论:ZDF(fa/fa)与ZDF(fa/+)大鼠在肠道菌群结构上有很大差异,糖耐康对ZDF大鼠血糖的改善作用可能是通过影响ZDF大鼠肠道中乳酸杆菌、普雷沃氏菌的丰度实现。

[关键词] 糖耐康; Zucker diabetic fatty (ZDF); 16S rRNA; 乳酸杆菌; 普雷沃氏菌

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)08-0098-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2017080098

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170210.0901.008.html>

[网络出版时间] 2017-02-10 9:01

Effect of Tangnaikang on Gut Microbiota Structure of Zucker Diabetic Fatty Rats with Spontaneous Type 2 Diabetes Mellitus

WU Li-juan¹, SUN Wen², WU Li-li², QIN Ling-ling³, GAO Jian⁴, MU Xiao-hong⁵, LIU Tong-hua^{6*}

(1. School of Clinical Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China;
2. Health-cultivation Research Institution, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;
3. Department of Science and Technology, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;
4. Information Institute, University of International Business and Economics, Beijing 100029, China;
5. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China;
6. School of Graduates, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the changes in gut microbiota structure after Tangnaikang (TNK) intervention in Zucker diabetic fatty rats (ZDF, fa/fa) and ZDF (fa/+) with spontaneous type 2 diabetes mellitus. **Method:** Six male ZDF (fa/+) rats were set as normal control group, and eighteen male (fa/fa) ZDF

[收稿日期] 20161026(009)

[基金项目] 北京市自然科学基金项目(7154219)

[第一作者] 吴莉娟,在读博士,从事中医药防治内分泌的研究,Tel:15801115036,E-mail:Drwu_513@163.com

[通讯作者] *刘铜华,博士,教授,从事中医药防治糖尿病及其并发症的临床和基础研究,Tel:010-64286950,E-mail:thliu@vip.163.com

rats (mean value of random blood glucose in different days $\geq 11.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) were set as T2DM model group and divided into model group (normal saline, $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$), TNK high-dose (TH, $3.24 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and TNK low-dose (TL, $0.81 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) groups depending on their body weight and random blood glucose (RBG), $n = 6$ in each group. After 6 weeks of drug administration, blood was taken from abdominal aorta to detect their fasting plasma glucose (FPG) and fasting serum insulin (FINS), fecal samples were collected from the rats to detect microbiota by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and amplicon pyrosequencing was taken to analyze the changes of microbiota in 16S rRNA V4 region. **Result:** Both TH group and TL group had significant differences in FPG and FINS as compared with model group ($P < 0.01$). There were significant differences in flora diversity and structure composition between various groups. At the family level and below, the abundance of *Lactobacillaceae* was increased in model group as compared with control group ($P < 0.05$); while as compared with model group, the abundance of *Lactobacillaceae* was decreased in TH group and TL group without statistical difference, and the abundance of *Prevotella* was significantly increased ($P < 0.01$), in addition, *Prevotella* had a positive correlation with FINS in ZDF rats. **Conclusion:** The ZDF (fa/fa) and their lean littermates ZDF (fa/+) had significant differences in microbial composition, and TNK may improve the blood glucose by affecting the abundance of *Prevotella* and the *Lactobacillaceae* in intestine of the ZDF rats.

[**Key words**] Tangnaikang (TNK); Zucker diabetic fatty (ZDF); 16S rRNA; *Lactobacillus*; *Prevotella*

自发性 2 型糖尿病 (T2DM) 是常见的代谢性疾病, 鉴于其病因复杂, 易出现严重的并发症, 致残、致死率高, 而受到大家的重视。近些年来, 关于肠道菌群结构改变与 T2DM 的研究越来越多^[1-2]。2012 年, 我国研究人员完成了肠道微生物与 T2DM 宏基因组关联分析 (MGWAS), 研究发现约 6 万种 T2DM 相关的基因标志物^[3], 为揭示 T2DM 与肠道微生物之间的关系奠定了分子基础。Forslund 等^[4]发现二甲双胍可以引发 T2DM 患者机体内肠道微生物的有利改变, 从而多途径有效地降低血糖水平。中医药在调控 T2DM 方面具有其独特优势。近年, 我国科学家发现葛根芩连汤可能通过改变肠道菌群缓解 T2DM, 为中药复方改善糖尿病过程中肠道菌群结构变化的研究提供思路^[5]。

糖耐康是根据中医理论, 并结合多年临床经验及现代药理研究成果所研制的中药复方, 具有清热生津、益气养阴的功效。既往动物实验和临床试验均表明其主要药理作用在于调节糖脂代谢, 增加胰岛素敏感性, 减轻胰岛素抵抗^[6-7]。目前针对糖耐康的研究中, 尚未涉及肠道菌群, 其调节糖脂代谢的作用是否与肠道菌群的调整相关不得而知。本文通过 16S rRNA 技术来比较 T2DM 大鼠模型与其正常组之间肠道中菌群结构的变化, 并观察糖耐康干预后 ZDF (Zucker diabetic fatty) 大鼠肠道菌群的变化, 旨在从肠道菌群这一作用机制验证糖耐康的降糖作用。

1 材料

1.1 动物 雄性 ZDF (fa/fa) 大鼠 17 只及 ZDF

(fa/+) 大鼠 6 只, 均购自北京维通利华实验技术有限公司, 合格证号 SCXK (京) 2012-0001, 7 周龄, 体重 (220 ± 10) g。大鼠在无特定病原体 (SPF 级) 条件下饲养, 饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物中心。饲养条件: 温度 (21 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 湿度 (60 ± 10)%, 12 h/12 h 光照黑暗循环。该实验已通过中国中医科学院中医基础理论研究所动物实验伦理会审查 (编号 2015-027), 符合实验动物伦理委员会相关指导原则。

1.2 试剂 戊巴比妥钠 (德国默克公司, 货号 57330), Phusion[®] High-Fidelity PCR Master Mix (英国 Biolabs 公司, 货号 F548S), TruSeq[®] DNA PCR-Free Sample Preparation Kit (美国 Illumina 公司, 货号 FC-121-3003), Trizol 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司, 批号 15596026), 蛋白酶 (proteinase) K (德国默克公司, 批号 1245680100), 胰岛素放免试剂盒和葡萄糖测试盒 (北京中生北控科技股份有限公司, 批号分别为 HY-10069, SHPTT60110)。引物序列由赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司合成, V4 区 (253 bp): 515F-5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3', 806R 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'。糖耐康颗粒由北京中医药大学药厂制备, 由人参、女贞子、夏枯草、三白草、番石榴叶组成。3 g/袋, 1 g 颗粒相当于生药 3.61 g。实验前用蒸馏水配制, 超声 30 min 后 4°C 保存。

1.3 仪器 3K15 型高速低温离心机 (美国 Sigma 公司), HiSeq2500 型高通量测序仪 (美国 Illumina

公司), T100 型梯度 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司), DL-CJ-2NDI 型超净工作台(中国东联哈尔滨仪器制造有限公司)。

2 方法

2.1 分组 大鼠适应性喂养 1 周后, 雄性 ZDF (fa/+)大鼠作为正常组, 予普通饲料喂养; 雄性 ZDF (fa/fa)大鼠给予上海介宏贸易有限公司生产的 PMI Labdiet 5008 饲料诱导 4 周, 随机血糖平均值 $\geq 11.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 者, 为成模大鼠, 共 18 只。按体重及随机血糖分层随机分为 3 组, 糖耐康低、高剂量 ($0.81, 3.24 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组及模型组(生理盐水 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), 各 6 只。给药组均按 $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的体重标准灌胃给药 1 次, 正常组和模型组则予相同剂量的生理盐水灌胃, 连续 6 周。大鼠均自由取食、饮水。

2.2 取材及指标检测 第 6 周, 末次给药后禁食不禁水 10 h, 予 1% 戊巴比妥钠麻醉, 腹主动脉取血, 分离血清, 以监测大鼠空腹血糖 (fasting plasma glucose, FPG) 及空腹血清胰岛素 (fasting serum insulin, FINS); 取大鼠新鲜粪便, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

2.3 细菌 DNA 提取, PCR 扩增及建库 将粪便放至离心管中研磨, 加入裂解液, 混匀后加入 Proteinase K 及溶菌酶, 颠倒混匀, $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育箱中孵育 2 h 后, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 吸取上清, 加入蛋白沉淀液, 涡旋 10 s 后置冰上 5 min, 再次离心, 抽取上清, 加入异丙醇, 混匀后冰上放置 20 min。离心后倒出液体, 沉淀物用 75% 乙醇 1 mL 反复洗涤 2 次, 离心, 弃上清, 白色沉淀适度干燥, 加入双蒸水 $50 \text{ } \mu\text{L}$, 震荡后加入 RNase A $1 \text{ } \mu\text{L}$, 颠倒混匀后 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 温育 15 min。以稀释后的基因组 DNA 为模板, 使用带 Barcode 的特异引物, 16S V4 区引物 515F-806R; Phusion Master Mix ($2 \times$) $15 \text{ } \mu\text{L}$ + Primer ($2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $3 \text{ } \mu\text{L}$ + gDNA ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) $10 \text{ } \mu\text{L}$ + H_2O $2 \text{ } \mu\text{L}$, $98 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 1 min; $98 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 s, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, 30 个循环; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min; 以 2% 琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳检测。以 2% 的琼脂糖胶电泳纯化 PCR 产物, 选择 400 ~ 450 bp 序列主带进行切割。使用 Illumina 公司的建库试剂盒 TruSeq DNA PCR-Free Library Preparation Kit 进行文库构建, 经过 Qubit 定量和文库检测合格后, HiSeq 上机测序。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件, 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 组间比较用单因素方差分析, 两组间数据比较通过 *T*-test 或 Wilcoxon 秩和检验或

Tukey 检验, 用于分析组间物种多样性差异是否显著。以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

3 结果

3.1 糖耐康对 ZDF 大鼠 FPG 及 FINS 的影响 与正常组大鼠比较, 模型组及各给药组大鼠 FPG 及 FINS 明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠 FPG 水平显著下降 ($P < 0.01$), FINS 水平明显升高 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 糖耐康对 ZDF 大鼠 FPG 及 FINS 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of TNK on FPG and FINS levels in ZDF rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

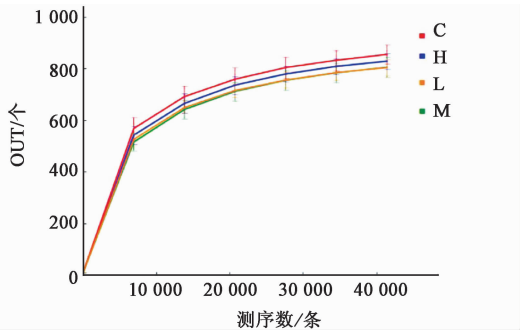
组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	FPG/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	FINS/ $\text{mU} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	4.02 ± 0.48	15.03 ± 2.22
模型	-	$24.87 \pm 4.62^{2)}$	$18.66 \pm 1.31^{1)}$
糖耐康	3.24	$13.38 \pm 6.05^{2,4)}$	$23.74 \pm 3.47^{2,4)}$
	0.81	$15.98 \pm 2.77^{2,4)}$	$22.95 \pm 4.89^{2,3)}$

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 糖耐康对 ZDF 大鼠肠道菌群 16S rRNA 的影响 送检 24 个 ZDF 大鼠粪便样本中, 有 23 个检验合格。通过检测 16S rRNA V4 区, 总共获得片段 2 459 761 个, 经过裁剪与修饰后获得 1 297 571 个。其中, 正常大鼠片段 334 508 个, 占总量的 25.78%; 模型组片段 353 116 个, 占总量的 27.21%; 治疗组片段中, 糖耐康高剂量组有 359 795 个, 占总量的 27.73%; 糖耐康低剂量组有 311 424 个, 占总量的 24.0%。大鼠片段从 47 425 个到 64 808 个, 平均为 56 416 个, 平均长度为 253 bp。

3.2.1 ZDF 大鼠肠道菌群的操作分类单元 (OTU) 分析 不同样品中最终得到的 OTUs 数量多于相似性 $> 97\%$ 的 OTUs 数量, 从样品中随机抽取一定测序的数据, 以此抽取的数据与对应物种数来构建的曲线即为稀释曲线, 其可直接反映测序数据的合理性, 并间接反映样品中物种的丰富程度, 稀释曲线见图 1。糖耐康高剂量组的物种分布的多样性和均匀度较模型组高, 较正常组低。

3.2.2 ZDF 大鼠肠道菌群多样性及均匀度分析 菌群的多样性及均匀度多采用 Alpha 多样性指数分析, 选取香农指数 (Shannon's diversity index, Shannon) 及辛普森指数 (Simpson's index, Simpson), 以表征样品中物种分布的多样性和均匀度。糖耐康高剂量的群落多样性及均匀度与模型组比较均显著升高 ($P < 0.01$); 与正常组比较无统计学差异。见表 2。



C. 正常组; H. 糖耐康高剂量组; L. 糖耐康低剂量组; M. 模型组 (图 2 ~ 7 同)

图 1 糖耐康对 ZDF 大鼠肠道菌群丰富程度影响的稀释曲线

Fig. 1 Rarefaction curve about effect of TNK on abundance of gut microbiota in ZDF rats

表 2 糖耐康对 ZDF 大鼠肠道菌群多样性及均匀度的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 2 Effect of TNK on gut microbial diversity and evenness in ZDF rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	Shannon 指数	Simpson 指数
正常	-	6.927 ± 0.379	0.97 ± 0.01
模型	-	$5.891 \pm 0.559^{2)}$	$0.89 \pm 0.05^{2)}$
糖耐康	3.24	$6.648 \pm 0.357^{3)}$	$0.96 \pm 0.01^{4)}$
	0.81	6.378 ± 0.351	$0.95 \pm 0.02^{3)}$

3.2.3 基于科及属水平的菌群差异性分析 在进化分支图中,由内至外辐射的圆圈代表了由门至属(或种)的分类级别。在不同分类级别上的每一个小圆圈代表该水平下的一个分类,小圆圈直径大小与相对丰度大小呈正比。差异物种 Biomarker 跟随组进行着色,红色节点表示在红色组别中起到重要作用的微生物类群,绿色节点表示在绿色组别中起到重要作用的微生物类群。英文字表示物种名称。LDA 值分布柱状图中展示了 LDA Score > 设定值(默认设置为 4)的物种,即组间有统计学差异的 Biomarker。展示了不同组中丰度差异显著的物种,柱状图的长度代表差异物种的影响大小(即为 LDA Score)。见图 2,3。

从进化分支图及 LDA-tree 可以看出,乳酸杆菌纲、乳杆菌科及梭菌纲、梭菌目为正常组与模型组间有显著差异的物种,见图 2。拟杆菌门水平下普雷沃氏菌属及螺旋体门水平下密螺旋体菌属为糖耐康高剂量组与糖耐康低剂量组间有显著差异的物种。见图 3。

在科水平上,选取每个样品在科水平上最大丰度排名前 10 的 OTUs 进行物种注释,生成物种相对丰度柱形累加图。ZDF 大鼠主要以普雷沃氏菌科

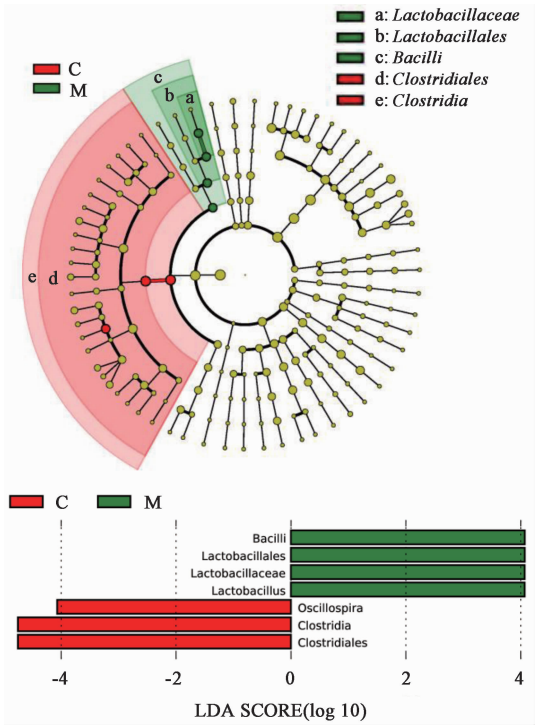


图 2 ZDF 大鼠与正常大鼠肠道微生物差异显著物种 LDA 值分布
Fig. 2 LDA histogram and LDA-tree of 16S rRNA gene from ZDF and normal rats

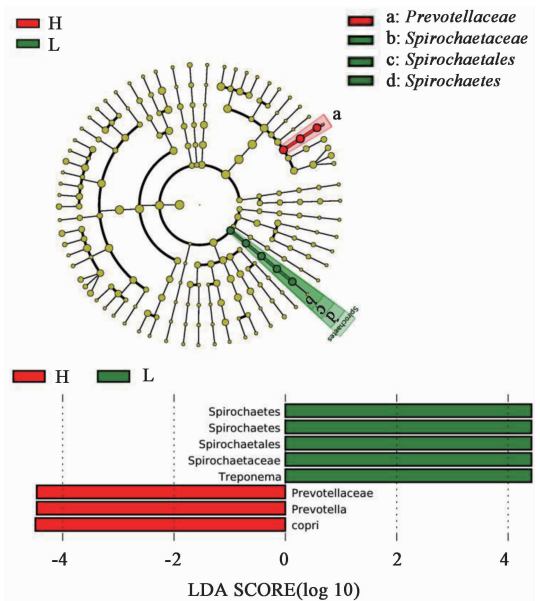


图 3 糖耐康干预 ZDF 大鼠肠道微生物差异显著物种 LDA 值分布
Fig. 3 LDA histogram and LDA-tree of 16S rRNA gene from ZDF rats intervene by TNK

Paraprevotellaceae, *Prevotellaceae*, S24-7, 瘤胃菌科 *Ruminococcaceae*, 毛螺旋菌科 *Lachnospiraceae* 为主。对该 5 种优势菌进行差异显著性分析,与正常组比较,模型组 *Paraprevotellaceae* 明显降低 ($P < 0.05$),乳酸杆菌科 *Lactobacillaceae* 明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,糖耐康高剂量组 *Prevotellaceae* 明显升

高 ($P < 0.05$) ; 糖耐康低剂量组 *Prevotellaceae* 显著升高 ($P < 0.01$)。见图 4。

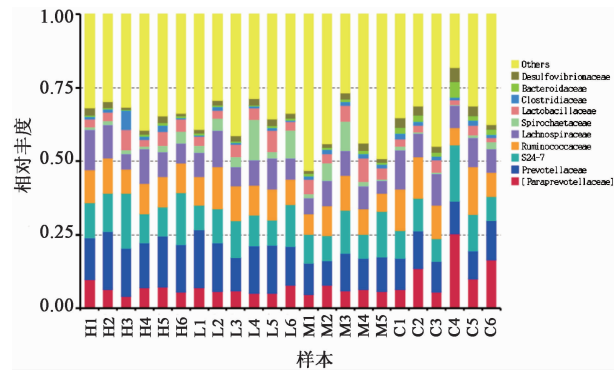


图 4 ZDF 大鼠肠道微生物科水平上物种相对丰度
Fig. 4 Histogram of relative abundance of gut microbiota on family level in ZDF rats

在属水平上,选取每个样品在属水平上最大丰度排名前 10 的 OTUS 进行物种注释,生成物种相对丰度柱形累加图。ZDF 大鼠主要以普雷沃菌属 [*Prevotella*], *Prevotella*, 密螺旋体菌属 *Treponema*, 颤螺菌属 *Oscillospira*, 乳酸杆菌属 *Lactobacillus* 为主。在该 5 种优势菌进行差异显著性分析发现,与正常组比较,模型组 *Prevotella* 显著降低, *Lactobacillus* 明显升高 ($P < 0.05$) ; 与模型组,糖耐康高剂量组 *Prevotella* 明显升高 ($P < 0.01$) ; 糖耐康低剂量组 *Prevotella* 显著升高 ($P < 0.01$)。见图 5。

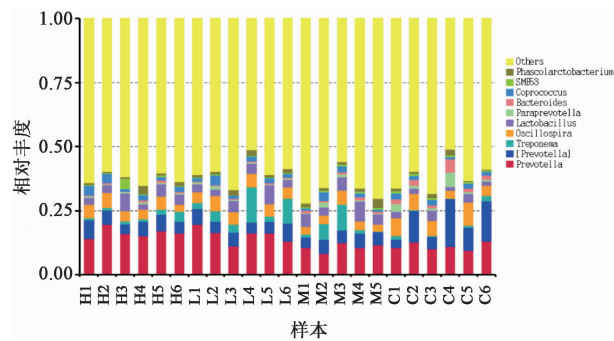
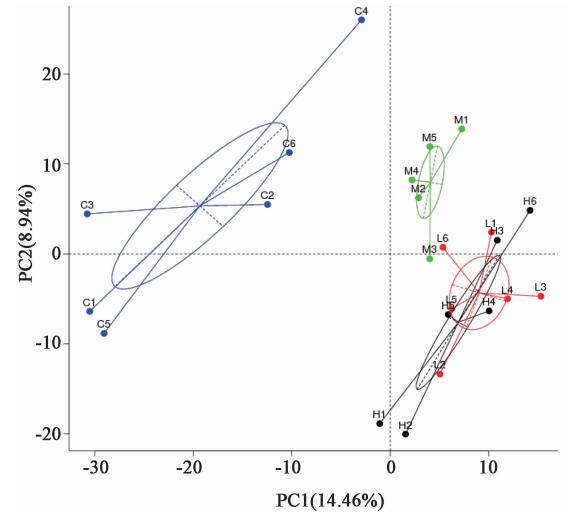


图 5 ZDF 大鼠肠道微生物属水平上物种相对丰度
Fig. 5 Histogram of relative abundance of gut microbiota on genus level in ZDF rats

3.2.4 ZDF 大鼠肠道菌群主成分分析 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 能最大程度反映样品间差异的两个坐标轴,从而将多维数据的差异反映在二维坐标图上,进而揭示复杂数据背景下的简单规律。组间样品的群落组成越相似,则它们在 PCA 图中的距离越接近。纳入本研究的 23 个样品存在明显的聚类现象,各组样品间无明显交叠趋势,这说明各组的样品间的肠道菌群属于同一种群,

具有明显相似性。第一主成分对样品差异的贡献值为 14.46% ; 第二主成分对样品差异的贡献值为 8.94%。见图 6。



每个点表示 1 个样品,同组样品用同种颜色表示
图 6 ZDF 大鼠肠道微生物主成分分析
Fig. 6 Principal component analysis of gut microbiota in ZDF rats

3.2.5 ZDF 大鼠肠道菌群影响的 UPGMA 聚类分析 为了研究不同样品间的相似性,通过对样品的距离矩阵进行 UPGMA 聚类分析,构建样品完整的聚类树。与正常组比较,ZDF 胖型大鼠拟杆菌门丰度增多,厚壁菌门丰度减少,但无统计学意义;与模型组比较,糖耐康高剂量组及糖耐康低剂量组拟杆菌门丰度减少,厚壁菌门丰度增加,但无统计学意义。见图 7。

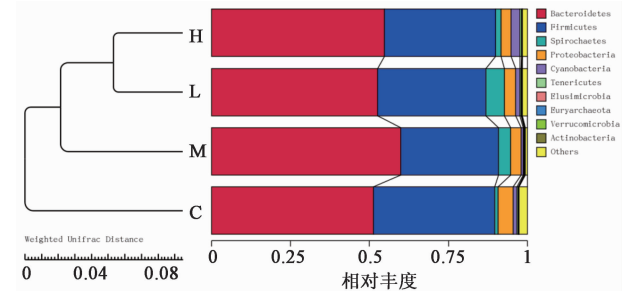


图 7 ZDF 大鼠肠道菌群影响 UPGMA 聚类分析
Fig. 7 Upgma cluster analysis of gut microbiota in ZDF rats

3.2.6 ZDF 大鼠肠道菌群与 FINS 的相关性 ZDF 大鼠血清胰岛素值与普雷沃氏菌属绝对丰度呈正相关。见图 8。

4 讨论

人体微生物遍布机体全身,其中大部分寄居于肠道,对人体的健康起着重要作用。众多研究表明, T2DM 与肠道菌群之间存在密切联系,糖尿病患者

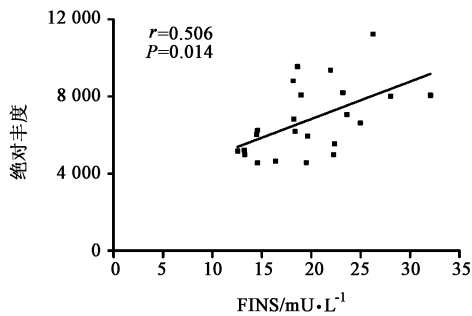


图 8 ZDF 大鼠肠道菌群与 FINS 的相关性

Fig. 8 Correlation between gut microbiota and FINS of ZDF rats

与非糖尿病者比较,菌群的丰度存在明显差异^[2,8-9]。QIN 等^[3]研究指出 T2DM 患者肠道内短链脂肪酸中丁酸盐的产生与梭菌属的细菌减少相关,从而影响糖脂代谢。

本实验中,稀释曲线显示此次检测物种的数量已达到足够的深度。正常组、模型组及糖耐康干预后 ZDF 大鼠的肠道菌群多样性——Shannon Wiener 指数有差异,糖耐康高剂量组物种分布的多样性和均匀度较模型组高,较正常组低。菌群多样性可能与糖耐康干预肠道菌群结构及分布相关。进一步对正常组[ZDF(fa/+)大鼠]、模型组[ZDF(fa/fa)大鼠]及糖耐康干预后 ZDF(fa/fa)大鼠肠道菌群进行检测发现,T2DM 大鼠与正常组大鼠的显著差异性物种为乳酸杆菌纲及其水平以下、梭菌纲及其以下物种。与正常组 ZDF(fa/+)大鼠比较,ZDF(fa/fa)大鼠肠道内乳酸杆菌科及以下水平显著升高。

肠道菌群主要由厚壁菌门、拟杆菌门两大类菌组成。厚壁菌门是一大类细菌,多数为革兰氏阳性。乳酸杆菌属属于厚壁菌门,能发酵碳水化合物产生乳酸,阻止有害菌在肠上皮的黏附;刺激免疫球蛋白的产生,增强宿主免疫力^[10-11],是目前国际上公认的最安全的菌种,也是目前应用最为广泛的益生菌种之一。据文献报道,乳酸杆菌与 T2DM 关系密切^[12-13]。本实验中发现,T2DM 大鼠肠道中的乳酸杆菌明显升高,这与近期采用 16S rRNA 对 ZDF 胖型大鼠胃肠道菌群的研究,乳酸杆菌属丰度与 ZDF 瘦型大鼠比较明显升高一致^[14]。此外,在以往的 T2DM 肠道菌群的研究中也发现其乳酸杆菌丰度升高明显^[15]。模型组大鼠经糖耐康干预后,乳酸杆菌丰度虽高于正常组,却明显下降。一方面与 ZDF 大鼠本身的肠道菌群结构有一定的相关性^[14]。另一方面,乳酸杆菌可阻止病原菌对肠道的入侵和定植,抑制病原菌,抗感染,抑制内毒素的产生,维持肠道的微生态平衡。模型组大鼠肠道中乳酸杆菌丰度

升高,可能与其抵御 T2DM 大鼠体内炎症水平有关。糖耐康干预后,其丰度明显降低,提示糖耐康可能通过影响 ZDF 大鼠肠道中乳酸杆菌属而改善糖尿病,其作用机制可能与炎症相关。

本实验中与正常组比较,模型组大鼠普雷沃氏菌明显降低;与模型组比较,糖耐康高、低剂量组普雷沃氏菌显著升高。作为糖耐康高剂量组大鼠的标志性差异物种,普雷沃氏菌属丰度与大鼠血清胰岛素呈正相关。Prevotella 属于拟杆菌门,是一种黏蛋白降解菌,与肠道的通透性相关^[16],除对抵御病原菌有重要作用外,能降解大量的多糖。最近研究显示,人体血糖浓度增高时厌氧菌的比例下降,特别是拟杆菌门^[17]。在近期的一项国外实验研究报道称^[18],在无菌小鼠肠道内移植正常患者的菌群,糖代谢得到改善的同时,普雷沃氏菌属的丰度也相应增加,提示普雷沃氏菌属可能有助于增加小鼠糖原储存。根据大鼠空腹血糖、血清胰岛素可见,糖耐康调节血糖稳态作用与普雷沃氏菌相关。

糖尿病病机多为阴虚内热。糖耐康由人参、夏枯草、女贞子、番石榴叶、三白草组成,具有清热生津、益气养阴的功效。现代药理学研究显示方中各药均具有抗糖尿病、抗炎症的作用。在肠道菌群的研究中发现,人参增加了厚壁菌门的丰度,抑制炎症因子的产生,在人体内环境与肠道菌群之间的平衡起到重要作用^[19]。这与本实验中,肠道菌群门水平上,糖耐康干预后 ZDF 大鼠拟杆菌门丰度减少,厚壁菌门丰度增加的结果一致。在国外肠道疾病研究中发现,厚壁菌门丰度的升高则提示炎症得以控制^[20]。这可能与糖耐康组方中各药的抗糖尿病、抗炎症相关^[21-24]。

综上,糖耐康对 ZDF 大鼠血糖的改善作用可能是通过影响大鼠肠道中乳酸杆菌及普雷沃氏菌的丰度相关。本实验样本量有限,需在将来的研究中加大样本量,并结合炎症指标,找出差异基因,以进一步探索其更深层次的作用机制。

[参考文献]

- [1] Haro C, Montes-Borrego M, Rangel-Zúñiga O A, et al. Two healthy diets modulate gut microbial community improving insulin sensitivity in a human obese population [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2016, 101 (1):233-242.
- [2] Blandino G, Inturri R, Lazzara F, et al. Impact of gut microbiota on diabetes mellitus [J]. Diabetes Metab, 2016, 42 (5):303-305.
- [3] QIN J, LI Y, CAI Z, et al. A metagenome-wide

- association study of gut microbiota in type 2 diabetes [J]. *Nature*, 2012, 490(7418):55-60.
- [4] Forslund K, Hildebrand F, Nielsen T, et al. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota [J]. *Nature*, 2015, 528(10):262-266.
- [5] XU J, ZHAO L P, TONG X L, et al. Structural modulation of gut microbiota during alleviation of type 2 diabetes with a Chinese herbal formula [J]. *Isme J*, 2015, 9(3):552-562.
- [6] 郭翔宇, 段颖, 刘铜华, 等. 糖耐康对肥胖 Zucker 大鼠血糖的影响及其机制 [J]. *中西医结合学报*, 2010, 8(6):535-537.
- [7] LI L Y, Hisae Y, LIU T H, et al. Tang-Nai-Kang alleviates pre-diabetes and metabolic disorders and induces a gene expression switch toward fatty acid oxidation in SHR. Cg-Leprep / NDmcr rats [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4):e0122024.
- [8] Cani P D, Bibiloni R, Knauf C, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice [J]. *Diabetes*, 2008, 57(6):1470-1481.
- [9] Larsen N, Vogensen F K, van den Berg F W J, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults [J]. *PLoS One*, 2010, 5(2):e9085.
- [10] Bernet M F, Brassart D, Neeser J R, et al. *Lactobacillus acidophilus* LA I binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria [J]. *Gut*, 1994, 35(4):483-489.
- [11] Sanz Y, Nadal I, Sanchez E. Probiotics as drugs against human gastrointestinal infections [J]. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, 2007, 2(2):148-156.
- [12] Yadav H, Jain S, Sinha P R. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats [J]. *Nutrition*, 2007, 23(1):62-68.
- [13] ZHAO L. Genomics: the tale of our other genome [J]. *Nature*, 2010, 465(7300):879-880.
- [14] GU C, YANG Y, XIANG H, et al. Deciphering bacterial community changes in Zucker diabetic fatty rats based on 16S rRNA gene sequences analysis [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(31):48941-48950.
- [15] LE K A, LI Y, XU X, et al. Alterations in fecal *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in type 2 diabetic patients in Southern China population [J]. *Front Physiol*, 2012, doi:10.3389/fphys.2012.00496.
- [16] Scher J U, Sczesnak A, Longman R S, et al. Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis [J]. *Elife*, 2013, doi:10.7554/eLife.01202.
- [17] Sepp E, Kolk H, Loivukene K, et al. Higher blood glucose level associated with body mass index and gut microbiota in elderly people [J]. *Microb Ecol Health Dis*, 2014, doi:10.3402/mehd.v25.22857. eCollection 2014.
- [18] Kovatcheva-Datchary P, Nilsson A, Akrami R, et al. Dietary fiber-induced improvement in glucose metabolism is associated with increased abundance of *Prevotella* [J]. *Cell Metab*, 2015, 22(6):971-982.
- [19] WANG C Z, YU C, WEN X D, et al. American ginseng attenuates colitis associated colon carcinogenesis in mice: impact on gut microbiota and metabolomics [J]. *Cancer Prev Res: Phila*, 2016, 9(10):803-811.
- [20] Natividad J M, Pinto-Sanchez M I, Galipeau H J, et al. Ecobiotherapy rich in *Firmicutes* decreases susceptibility to colitis in a humanized gnotobiotic mouse model [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2015, 21(8):1883-1893.
- [21] 汪梅花, 魏文浩, 吴振强. 番石榴叶的生物活性研究进展 [J]. *中药材*, 2015, 38(10):2215-2218.
- [22] 刘亭亭, 王萌. 女贞子化学成分与药理作用研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(14):228-234.
- [23] 马林, 吴丰, 陈若芸. 三白草科植物化学及生物活性研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2003, 28(3):196-198.
- [24] 刘悦, 宋少江, 徐绥绪. 夏枯草的化学成分及生物活性研究进展 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2003, 20(1):55-59.

[责任编辑 张丰丰]