

基于16S rRNA技术研究萎连丸对2型糖尿病db/db小鼠肠道菌群的影响

彭川^{1,2}, 胡学芳¹, 陈正涛¹, 窦晨瑜³, 杨鹏³, 丁雷⁴, 吴丽丽², 秦灵灵⁵, 刘铜华^{2,5*}

(1. 成都中医药大学临床医学院, 成都 610036; 2. 北京中医药大学中医养生研究所, 北京 100029;
3. 陕西中医药大学第一临床医学院 西安 711301; 4. 北京中医药大学第二临床医学院, 北京 100078;
5. 北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] 目的:研究萎连丸对2型糖尿病db/db小鼠肠道菌群的影响。方法:取4~5周龄雄性db/m+小鼠为正常组,将同周龄成模雄性db/db小鼠根据血糖、体质量随机分为模型组、二甲双胍组(0.25 g·kg⁻¹·d⁻¹)及萎连丸组(13 g·kg⁻¹·d⁻¹),每组6只药物干预5周,每周记录小鼠体质量、进食水量及空腹血糖(FBG),5周后检测空腹血糖、肝脏甘油三酯(TG)、肝脏总胆固醇(TC)、糖化血清蛋白(GSP)、空腹血清胰岛素(FINS),同时计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR);收集小鼠肠道内粪便,应用16S rRNA技术检测各组小鼠粪便肠道菌群结构变化。结果:与正常组比较,模型组体质量、进食水量、FBG、肝脏TG、肝脏TC、GSP、FINS及HOMA-IR显著升高($P<0.01$);与模型组比较,萎连丸组可显著降低db/db小鼠饮水量、FBG、肝脏TG、肝脏TC、GSP、FINS及HOMA-IR($P<0.01$);萎连丸组肠道菌群从门到属水平平均发生了变化,有益菌相对丰度增加,有害菌相对丰度减少。其中,嗜黏蛋白阿克曼菌、布劳特氏菌、瘤胃球菌、副拟杆菌丰度显著增加($P<0.01$)。结论:萎连丸可以显著改善2型糖尿病db/db小鼠糖脂代谢,其机制可能与增加肠道中嗜黏蛋白阿克曼菌、布劳特氏菌、瘤胃球菌、副拟杆菌丰度有关。

[关键词] 萎连丸; 2型糖尿病; 糖脂代谢; 16S rRNA; db/db小鼠

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)12-0063-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20222107 **[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.20230131.1459.008.html>

[网络出版日期] 2023-01-31 17:36:16

Effect of Loulianwan on Gut Microbiota in db/db Mice with Type 2 Diabetes Mellitus Based on 16S rRNA Sequencing Technology

PENG Chuan^{1,2}, HU Xuefang¹, CHEN Zhengtao¹, DOU Chenyu³, YANG Peng³, DING Lei⁴,
WU Lili², QIN Lingling⁵, LIU Tonghua^{2,5*}

(1. School of Clinical Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610036, China; 2. Institute of Chinese Medicine Health Preservation, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 3. The First School of Clinical Medicine, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 711301, China; 4. Second Clinical College, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China; 5. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Loulianwan on the gut microbiota of db/db mice with type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Method:** Male db/m+ mice aged 4-5 weeks were assigned to the normal group, and male db/db model mice of the same age were randomly divided into model group, metformin group

[收稿日期] 2022-09-13

[基金项目] 教育部中医药防治糖尿病及其并发症创新引智基地项目(B20055);北京中医药大学校级科研纵向发展基金项目(2020-ZXFZJJ-005)

[第一作者] 彭川,在读博士,从事中医药防治内分泌代谢疾病的临床与实验研究,E-mail:1129392694@qq.com

[通信作者] *刘铜华,博士,教授,主任医师,博士生导师,从事中医药防治内分泌代谢疾病的临床与实验研究,E-mail:thliu@vip.163.com

($0.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), and Loulianwan group ($13 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), with six mice in each group. Drug intervention lasted five weeks. The body weight, water intake, and fasting blood glucose (FBG) of the mice were recorded every week. After five weeks, the FBG, liver triglyceride (TG), liver total cholesterol (TC), glycosylated serum protein (GSP), and fasting serum insulin (FINS) were detected, and the insulin resistance index (HOMA-IR) was calculated. The feces in the mouse intestines were collected, and the 16S rRNA sequencing technology was used to detect the structural changes in the fecal gut microbiota of mice in each group. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed increased body weight, water intake, FBG, liver TG, liver TC, GSP, FINS, and HOMA-IR ($P < 0.01$). Compared with the model group, the Loulianwan group showed reduced water intake, FBG, liver TG, liver TC, GSP, FINS, and HOMA-IR ($P < 0.01$). The gut microbiota in the Loulianwan group changed from phylum to genus level. The relative abundance of beneficial bacteria increased and the relative abundance of harmful bacteria decreased. Among them, the abundance of *Akkermansia muciniphila*, *Blautia*, *Ruminococcus*, and *Parabacteroides* increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** Loulianwan can significantly improve glucose and lipid metabolism in db/db mice with T2DM, and its mechanism may be related to the increase in the abundance of *Akkermansia muciniphila*, *Blautia*, *Ruminococcus*, and *Parabacteroides* in the intestine.

[Keywords] Loulianwan; type 2 diabetes mellitus; glycolipid metabolism; 16S rRNA sequencing technology; db/db mice

2型糖尿病是由于胰岛素分泌不足和(或)胰岛素作用缺陷,以胰岛素抵抗、糖脂代谢紊乱为特征的慢性代谢性疾病^[1]。根据国际糖尿病联合会(IDF)发布第10版^[2]《全球糖尿病地图》数据显示,2021年全球约有5.4亿糖尿病患者,预计到2045年,全球糖尿病患者人数可能达到7.83亿。而我国糖尿病患者约有1.409亿人,其中绝大部分患者被确诊为2型糖尿病。据估计,2021年全球糖尿病健康支出约为9 660亿美元,给国家和人民带来了沉重的经济负担。肠道菌群是存在于人体的“微生物器官”,参与宿主物质代谢和能量代谢。肠道菌群在2型糖尿病的发生发展中起着至关重要的作用^[3-4]。研究表明肠道菌群可通过降低肠道通透性、增加炎症反应等多种机制参与2型糖尿病的发生发展^[5-6]。因此,调节肠道菌群是治疗2型糖尿病的重要手段。

现代医学所说“糖尿病”归属于中医“脾瘕、消渴”等范畴,随着中医理论不断完善和发展,多数医家认为消渴病的基本病机为阴虚燥热,以阴虚为本,燥热为标,两者互为因果,故治疗以清热润燥,养阴生津为主^[7]。萹连丸出自于《卫生简易方》,由黄连、天花粉组成,具有清热泻火,生津止渴的功效,主治消渴、小便频数滑如油。其中,黄连、天花粉被誉为“消渴圣药”,早在《名医别录》就有“黄连止消渴”的记载,而《神农本草经》中记载:“栝楼根,主消渴,身热烦满,大热,补虚安中”。现代药理学研究表明,黄连、天花粉具有降血糖、降血脂、抗氧

化应激、抑制炎症反应等多种药用功效,可用于2型糖尿病的治疗^[8-11]。此外,冯兴中教授运用萹连丸加减治疗2型糖尿病患者8周,可以改善糖尿病患者症状、降低空腹血糖、餐后2 h血糖、甘油三酯、胆固醇等相关指标^[12]。目前尚缺乏萹连丸对肠道菌群影响的研究,其改善糖脂代谢的作用是否与调节肠道菌群有关尚不明确。因此,本研究以自发性2型糖尿病动物模型db/db小鼠为研究对象,通过16S rRNA测序技术探究萹连丸对db/db小鼠肠道菌群的影响,旨在从肠道菌群机制方面验证萹连丸的降糖作用。

1 材料

1.1 动物 雄性SPF级18只db/db小鼠,4~5周龄,体质量(30 ± 2) g,同周龄雄性野生型(db/m+)小鼠6只,实验动物均购于江苏常州卡文斯实验动物有限公司,合格证号SCXK(苏)2016-0010。小鼠饲养于北京中医药大学SPF级动物研究实验室。饲养环境及条件为温度(24 ± 2) °C,湿度 $50\% \pm 10\%$,每日进行12 h/12 h光黑循环,动物自由摄食水,普通饲料喂养。本动物实验已通过北京中医药大学动物伦理审查,批准编号BUCM-4-2021092403-3185。

1.2 药物 黄连(批号21042912)、天花粉(批号21092807)均购于安徽协和成药业饮片有限公司,均经北京中医药大学中药学院徐瞰海教授鉴定为正品。药物提取步骤:黄连、天花粉各1 kg,加10倍的蒸馏水浸泡30 min,水煎煮沸60 min,用纱布过滤

水煎液;再次加入8倍蒸馏水,煮沸45 min,纱布过滤水煎液,收集2次煎煮液进行浓缩,并在真空冷冻器下干燥得粉末(出膏率约为18.92%),放入4℃冰箱备用。

1.3 试剂 甘油三脂(TG)、总胆固醇(TC)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号分别为A110-1-1、A111-1-1);小鼠胰岛素(FINS)、糖化血清蛋白(GSP)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(江苏晶美生物科技有限公司,货号分别为JM-02862M1、JM-11555M1)。

1.4 仪器 KQ-500DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);3K15型低温离心机(美国Sigma公司);2700型PCR扩增仪(美国Applied Biosystems公司);FLX800T型酶标仪(美国BioTek公司);DYY-6C型电泳仪、DYCZ-40D型转膜仪(北京六一生物科技有限公司);BG-gdsAUTO 130型凝胶成像系统(北京百晶生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 准备18只4~5周龄SPF级雄性db/db小鼠,适应性喂养1周后,尾尖取血检测空腹血糖,以不同日空腹血糖 $>7.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 且随机血糖 $\geq 11.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为2型糖尿病成模条件,并根据血糖、体质量分层随机法分为3组,每组6只,模型组、二甲双胍组($0.25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和萹连丸组($13\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),以6只db/m+同窝雄性小鼠为作为正常组。马伯艳等^[13]研究表明以体质量70 kg成人计算,黄连每天用量约25 g即可能有降糖效果,本研究给药剂量为临床剂量的2倍,即黄连、天花粉各50 g。根据小鼠与成人的体表面积换算公式,萹连丸组小鼠灌胃等效剂量为 $13\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。而模型组和正常组给予同等体积的蒸馏水灌胃($10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),每天1次,连续5周。

2.2 标本采集及处理 药物干预5周后,小鼠禁食不禁水12 h,摘眼球取血,室温静置30 min,4℃条件下 $3\ 500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min(离心半径10 cm),吸取上清液,-80℃冰箱保存,用于血清生化及空腹血清FINS、GSP等指标检测。各组小鼠取完血后迅速开腹,取出肠组织,其中肠内容物用干净无菌冻存管收集,放于-80℃冰箱,以便后续进行肠道菌群实验。

2.3 一般指标 每周观察并记录小鼠精神状态、活动情况、饮食、饮水、毛色及体质量变化情况。

2.4 血糖、血脂相关指标检测 应用比色法测肝脏匀浆组织中TC、TG水平。采用ELISA测定小鼠

FINS、GSP,并计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)= $\text{FBG}\times\text{FINS}/22.5$ 。

2.5 肠道菌群16S rRNA高通量测序 收集各组小鼠粪便样本,采用Mag-bind soil DNA kit按照说明书对小鼠粪便样本进行DNA提取,用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳分别测量所提取DNA的数量和质量后。对16S rRNA基因V3~V4区进行扩增,引物序列为上游引物338F(CTCCTACGGGAGGCAGCA),序列长度19 bp;下游引物806R(GGACTACHVGGGTWTCTAAT),序列长度20 bp。扩增体系($25\ \mu\text{L}$): $5\times\text{reaction buffer}$ $5\ \mu\text{L}$, $5\times\text{GC buffer}$ $5\ \mu\text{L}$,dNTP($2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $2\ \mu\text{L}$,Forward primer($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) $1\ \mu\text{L}$,Reverse primer($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) $1\ \mu\text{L}$,DNA Template $2\ \mu\text{L}$,双蒸水 $8.75\ \mu\text{L}$,Q5 DNA Polymerase $0.25\ \mu\text{L}$ 。PCR扩增条件为98℃预变性30 s,98℃变性15 s,50℃退火30 s,72℃延伸30 s,27个循环,最后72℃延伸5 min。PCR扩增产物进行2%的琼脂糖凝胶电泳检测,并对目标片段使用Axygen凝胶回收试剂盒进行回收。利用Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit在Microplate reader定量仪器上对PCR产物进行定量后。采用Illumina公司的TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit进行建库,质检合格的文库经定量和0.1N NaOH变性成单链后,使用Illumina NovaSeq测序仪进行双端测序。原始序列数据使用demux插件进行解码处理,cutadapt插件进行引物切除,然后使用DADA2插件对序列进行质量过滤、去噪,拼接及去除嵌合体,以100%相似度阈值进行分类单元(OTU)聚类,并应用QIIME2软件进行微生物组生物学信息分析。

2.6 统计学方法 采用SPSS 21.0统计软件进行数据处理和分析,计量资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,对组独立样本比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),非正态分布数据采用多样本非参数检验。满足方差齐性是采用最小显著性差异法(LSD),不满足方差齐性时采用非参数检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况 与正常组比较,模型组小鼠逐渐出现精神萎靡、反应迟钝、毛色无光泽、活动减少、以及多饮、多食和多尿等症状;与模型组比较,二甲双胍组及萹连丸组可改善小鼠精神状态,增加活动能力,并能改善小鼠多饮、多食等症状。见表1。

3.2 对db/db小鼠体质量的影响 在药物干预之

表 1 萎连丸对 db/db 小鼠平均进食、进水量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Effect of Loulianwan on average food and water intake of db/db mice ($\bar{x}\pm s, n=6$) g

组别	剂量/g·kg ⁻¹	平均进食量	平均进水量
正常组		4.49±1.02	4.44±0.56
模型组		8.80±1.25 ²⁾	24.26±1.58 ²⁾
二甲双胍组	0.25	8.58±1.24	17.33±1.43 ⁴⁾
萎连丸组	13	7.85±0.80	14.01±0.71 ⁴⁾

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-表 5 同)

前,与正常组比较,模型组体质量显著升高($P<0.01$);而模型组、二甲双胍组及萎连丸组体质量差异无统计学意义,基线水平一致。与模型组比较,药物干预后,各组小鼠体质量随着周龄的增加而增长,各给药组与模型组体质量差异无统计学意义。表明二甲双胍、萎连丸对 db/db 小鼠的体质量无明显影响。见表 2。

表 2 萎连丸对 db/db 小鼠体质量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Loulianwan on db/db mice body weight ($\bar{x}\pm s, n=6$) g

组别	剂量/g·kg ⁻¹	第 0 周	第 5 周
正常组		20.11±1.00	24.30±1.07
模型组		32.46±1.08 ²⁾	46.40±3.22 ²⁾
二甲双胍组	0.25	34.42±2.61	46.57±2.04
萎连丸组	13	32.91±2.29	44.45±3.52

3.3 对 db/db 小鼠 FBG、肝脏 TG、TC 的影响 与正常组比较,模型组小鼠 FBG、TC 水平均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,二甲双胍及萎连丸组可显著降低小鼠 FBG、TC 水平($P<0.01$)。与正常组相比,模型组小鼠 TG 水平均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,萎连丸组可显著降低小鼠 TG 水平($P<0.01$),二甲双胍可降低小鼠 TG 水平,但差异无统计学意义。见表 3。

表 3 萎连丸对 db/db 小鼠 FBG、肝脏 TG、TC 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Loulianwan on FBG, liver TG and TC of db/db mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	FBG /mmol·L ⁻¹	TG /mmol·g ⁻¹	TC /mmol·g ⁻¹
正常组		3.98±0.43	0.59±0.11	0.18±0.02
模型组		26.22±2.55 ²⁾	1.17±0.19 ²⁾	0.27±0.03 ²⁾
二甲双胍组	0.25	14.45±1.60 ⁴⁾	0.99±0.21	0.19±0.03 ⁴⁾
萎连丸组	13	12.42±2.22 ⁴⁾	0.77±0.12 ⁴⁾	0.18±0.04 ⁴⁾

3.4 对 db/db 小鼠 FINS、GSP 及 HOMA-IR 的影响

与正常组比较,模型组小鼠 FINS、HOMA-IR、GSP 水平均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,二甲双胍及萎连丸组可显著降低小鼠 FINS、HOMA-IR、GSP 水平($P<0.01$)。见表 4。

表 4 萎连丸对 db/db 小鼠 FINS、HOMA-IR、GSP 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Loulianwan on FINS, HOMA-IR and GSP in db/db mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	FINS /mU·L ⁻¹	HOMA-IR	GSP /mmol·L ⁻¹
正常组		7.78±0.20	1.36±0.98	1.15±0.19
模型组		16.32±0.97 ²⁾	19.38±1.69 ²⁾	2.27±0.22 ²⁾
二甲双胍组	0.25	12.49±0.32 ⁴⁾	8.61±1.37 ⁴⁾	1.32±0.16 ⁴⁾
萎连丸组	13	13.46±0.54 ⁴⁾	7.42±1.64 ⁴⁾	1.40±0.13 ⁴⁾

3.5 各组小鼠肠道菌群分析

3.5.1 稀释曲线和 Alpha 多样性分析 稀释曲线(rarefaction curve)主要反映各样本在不同测序数量时的微生物多样性。随着测序数量的增加,各组稀释曲线逐渐平缓,说明本次测序所得的数据量满足测序要求,可以代表测序样本中包含的绝大多数的微生物信息(见增强出版附加材料)。

Alpha 多样性是指在特定区域或者生态系统内物种的多样性。常用度量指标主要有 Shannon 指数、Simpson 指数、Chao1 指数、Good's Coverage 指数。其中 Shannon/Simpson 指数是反应 α 多样性两个重要指标,其指数越高,物种 Alpha 多样性越高;Chao1 指数主要反映样品中菌群总数,数值越大代表样本中菌群数越多;Good's Coverage 指数主要反映样本覆盖情况,其指数越高,则样本中未被检测出的物种所占比例越少。小鼠肠道菌群 α 多样性 Shannon、Simpson、Chao1 及 Coverage 指数结果如下。各组 Coverage 指数接近于 1,则表明测序深度已经基本涵盖到样品中所有物种。与正常组比较,模型组 Coverage 指数明显降低($P<0.05$),Simpson 指数、Chao1 指数显著增加($P<0.01$);与模型组比较,萎连丸组 Shannon 指数、Chao1 指数显著低于模型组($P<0.01$),同时 Simpson 指数降低($P<0.05$),Coverage 指数明显增加($P<0.05$)。见表 5。

3.5.2 门水平菌群丰度及差异 在门水平,各组小鼠菌群主要由拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、疣微菌门(Verrucomicrobia)等组成,其中拟杆菌门和厚壁菌门所占比较大。与正常组比较,模型组拟杆菌门相

表5 各组小鼠肠道菌群Alpha多样性指数比较 ($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 5 Comparison of Alpha diversity index of intestinal flora of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	Shannon 指数	Simpson 指数	Coverage 指数	Chao1 指数
正常组	7.33±0.81	0.962 1±0.036 6	0.993 9±0.002 2	1 733.64±351.06
模型组	7.89±0.49	0.966 0±0.014 6 ¹⁾	0.989 8±0.002 6 ¹⁾	2 713.99±341.82 ²⁾
萎连丸组	5.24±0.39 ^{2,4)}	0.930 5±0.006 8 ³⁾	0.997 0±0.000 8 ³⁾	682.02±198.04 ^{2,4)}

对丰度降低,厚壁菌门相对丰度增加。与模型组比较,萎连丸组厚壁菌门和拟杆菌门丰度降低($P<0.05$),变形菌门和疣微菌门丰度增加($P<0.01$),见增强出版附加材料。

3.5.3 属水平菌群丰度及差异 在属水平上,小鼠肠道优势菌群主要为拟杆菌属(*Bacteroides*)、副拟杆菌属(*Parabacteroides*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、嗜黏蛋白阿克曼菌属(*Akkermansia*)等。与正常组比较,模型组乳杆菌属相对丰度增加,拟杆菌属相对丰度减少。与模型组比较,萎连丸组乳杆菌属和拟杆菌属相对丰度减少;副拟杆菌属、嗜黏蛋白阿克曼菌、布劳特氏菌、瘤胃球菌相对丰度显著增加($P<0.01$),见增强出版附加材料。

3.5.4 LEfSe 多级物种差异分析 LEfSe是一种用于发现和解释高维度数据生物标识的工具。LEfSe分析不仅可以对所有分类水平同时进行差异分析,同时还能寻找分组之间稳健的差异物种,即标志物种。是从门到属水平下各组样本LDA值分布图,物种的LDA值用横坐标表示,LDA值 >4 的物种为具有统计学差异的物种。LEfSe分析结果表明,正常组对群落结构影响较大的物种有拟杆菌纲(*Bacteroidia*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、理研菌科(*Rikenellaceae*)、另枝菌属(*Alistipes*)等。模型组中对群落结构影响较大的物种有乳杆菌属(*Lactobacillus*)、S24_7、等。萎连丸组中对群落菌群结构影响较大的物种有嗜黏蛋白阿克曼菌(*Akkermansia*)、副拟杆菌属(*Parabacteroides*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)、布劳特氏菌(*Blautia*)、变形菌门(*Proteobacteria*)等,见增强出版附加材料。

3.5.5 肠道菌群功能预测 根据物种注释和OTU丰度信息,使用PICRUST2软件对db/db小鼠肠道样品进行KEGG功能注释,总共发现32条功能通路与小鼠肠道菌群相关,其中丰度排行前15的代谢通路主要有:碳水化合物代谢(Carbohydrate metabolism)、能量代谢(Energy metabolism)、糖合成与代谢(Glycan biosynthesis and metabolism)、氨

基酸代谢(Amino acid metabolism)、因子和维生素代谢(Metabolism of cofactors and vitamins)、萜类化合物和聚酮化合物的代谢(Metabolism of terpenoids and polyketides)、其他氨基酸代谢(Metabolism of other amino acids)、脂质代谢(Lipid metabolism)、复制和修复(Replication and repair)、翻译(Translation)、核苷酸代谢(Nucleotide metabolism)等。其中碳水化合物代谢、糖合成与代谢、能量代谢、核苷酸代谢和脂质代谢等通路与糖尿病发病机制密切相关,其相关通路紊乱可导致db/db小鼠肠道菌群失调,见增强出版附加材料。

4 讨论

随着社会经济的发展、人们饮食结构的改变,高糖、高脂过量的摄入,导致糖尿病的发病率增加,糖尿病已成为全球第3位严重危害人类健康的慢性疾病。目前常用的降糖药物虽能控制血糖,但长期服用会出现不同程度地的耐药性及不良反应,如低血糖、胃肠道反应、乳酸中毒等^[14],造成糖尿病患者治疗配合率降低。因此,寻找一种安全高效、不良反应小的治疗方式迫在眉睫。中医药治疗糖尿病历史悠久,在调控血糖方面具有多靶点、多途径、整体调节的独特优势^[15-17],已成为预防和治疗糖尿病的研究热点。因此,本研究以传统中医药为突破口,使用萎连丸对2型糖尿病模型db/db小鼠进行治疗。经药物干预5周后,萎连丸可显著降低db/db小鼠进水量及FBG、GSP、FINS、HOMA-IR、TG、TC水平。因此,萎连丸可改善db/db小鼠糖脂代谢水平和胰岛素抵抗。

糖尿病(消渴症)在中医古籍已有较多记载,汉代张仲景在《金匱要略》中重视火热邪气在消渴发病中的作用;金代刘完素在《三消论》中指出消渴病机为“燥热太甚”。古代医家普遍认为消渴病因虽多,但最终皆可日久化热,耗伤津液而引发消渴^[18-19]。萎连丸具有清热泻火、生津止渴的功效,符合消渴阴虚燥热的主要病机。赵蕾等^[20]研究古代治疗消渴(糖尿病)处方发现黄连、天花粉配伍频次最高,为古代治疗消渴病的首选组合。刑颖等^[21]基

于中国中医科学院门诊2 843名2型糖尿病患者中药处方研究发现,黄连-天花粉是置信度较高的配伍组合。临床研究证实,黄连提取物颗粒剂量超过 $0.08\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 能显著改善2型糖尿病患者糖脂代谢水平,而且无明显肝肾毒性^[22]。体外实验研究表明,黄连可通过抑制炎症因子IL-6、TNF- α 表达,增强胰岛细胞活力,进而发挥抗糖尿病的作用^[23]。体内实验研究证实小檗碱可改善2型糖尿病大鼠糖脂代谢水平,其机制可能与小檗碱通过调节肠道菌微生物群丰富度和多样性,增加有益菌数量,降低有害菌数量以及结肠内容物和血清中芳香族氨基酸水平有关^[24]。此外,小檗碱还可通过调节肠道菌群增加肠道中SCFA含量,提高肠道上皮闭锁蛋白和ZO-1紧密连接蛋白的表达,降低内毒素相关基因和促炎基因的表达,最终起到修复肠道黏膜损伤,抑制炎症反应及改善糖尿病小鼠FBG和糖化血红蛋白(HbA1c)水平^[25]。LO等^[26]研究表明天花粉蛋白可激活胰岛素受体激酶的活性,增强糖尿病小鼠的葡萄糖清除率,进而降低血糖水平。然而,目前关于天花粉治疗糖尿病的研究主要侧重于药效学方面,其降糖机制是否与肠道菌群相关有待进一步研究。上述研究表明,萎连丸应用于2型糖尿病治疗有充分的药理学基础。

肠道菌群是寄生于人体内的微生态系统,对人体健康起着重要的作用。众多研究表明,2型糖尿病与肠道菌群关系密切,糖尿病患者与健康志愿者相比较,肠道微生物的丰度存在明显差异^[3,27-28]。ZHAO等^[29]研究指出肠道微生物可通过碳水化合物发酵产生对人体有益的短链脂肪酸(SCFA),而2型糖尿病与短链脂肪酸缺乏有关。肠道菌群门级群落主要由4大类菌门组成,其中以拟杆菌门和厚壁菌门占主导,以及放线菌门和变形菌门^[30]。研究表明,肠道厚壁菌门和拟杆菌门与机体糖脂代谢密切相关^[31-32],在本研究中,通过对比肠道菌群门、属丰度发现,在门水平上,模型组厚壁菌门相对丰度增多,拟杆菌门相对丰度减少,且拟杆菌门与厚壁菌门比值(B/F)显著降低,而B/F下降被认为是肠道菌门紊乱的诊断标志。经萎连丸干预后,疣微菌门相对丰富显著增加,厚壁菌门显著减少,而拟杆菌门不升反降,B/F值降低,可能与老鼠所处状态、参考数据库有关。在属水平上,模型组拟杆菌属相对丰度降低,乳杆菌相对丰度升高。乳杆菌虽是益生菌,但由于是厌氧菌,当机体循环内炎症水平升高,导致肠内组织缺氧,因此在模型组中观察到乳杆菌

相对丰度升高^[33]。经萎连丸干预后,乳杆菌相对丰度降低,副拟杆菌属、嗜黏蛋白阿克曼菌、布劳特氏菌、瘤胃球菌相对丰度增加。肠道中嗜黏蛋白阿克曼菌是治疗2型糖尿病的潜在生物标志。研究表明,阿克曼菌可以通过下调炎症因子的表达,发挥抗炎作用,从而降低血糖水平^[34]。另有研究证实,阿克曼菌还可以通过激活肠道内胰高血糖素样肽-1(GLP1)产生,调节机体能量代谢,改善葡萄糖稳态,进而调节血糖水平^[35]。Blautia可通过产生细菌素来防止病原体的定植,并通过上调调节性T细胞和SCFA的产生而表现出抗炎特性和维持葡萄糖稳态的作用^[36]。瘤胃球菌、副拟杆菌属于SCFA产生属,糖尿病中富集SCFA产生的细菌可增强肠道抗炎反应能力,提高胰岛素敏感性^[37-39]。以上结果表明,2型糖尿病db/db小鼠肠道菌群出现紊乱,经过萎连丸干预5周后,可能通过上调嗜黏蛋白阿克曼菌、Blautia、瘤胃球菌、副拟杆菌相对丰度等方式改善2型糖尿病。

综上所述,萎连丸具有降糖、降脂的作用,可以显著改善2型糖尿病db/db小鼠糖脂代谢紊乱,其机制可能与增加小鼠肠道嗜黏蛋白阿克曼菌、Blautia、瘤胃球菌、副拟杆菌丰度有关。虽然本研究所用样本量满足测序深度要求,但样本量仍相对不足,在后续的研究中可加大样本量,并结合代谢组学、宏基因组学、宏转录组学等相关研究方法,以期更加深入探索其作用机制。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] SAJAN M P, LEE M C, FOUFELLE F, et al. Coordinated regulation of hepatic FoxO1, PGC-1 α and SREBP-1c facilitates insulin action and resistance [J]. *Cell Signal*, 2018, 43: 62-70.
- [2] International Diabetes Federation. Diabetes atlas (tenth edition) [EB/OL]. [2021-12-xxx]. <https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/>.
- [3] YANG G, WEI J, LIU P, et al. Role of the gut microbiota in type 2 diabetes and related diseases [J]. *Metabolism*, 2021, 117: 154712.
- [4] GURUNG M, LI Z, YOU H, et al. Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology [J]. *EBioMedicine*, 2020, 51: 102590.
- [5] KARLSSON F, TREMAROLI V, NIELSEN J, et al. Assessing the human gut microbiota in metabolic diseases [J]. *Diabetes*, 2013, 62(10): 3341-3349.
- [6] PLOVIER H, EVERARD A, DRUART C, et al. A

- purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice[J]. *Nat Med*, 2017, 23(1):107-113.
- [7] 姜广坤,牛雯颖,张文妮,等. 连梅汤对糖尿病模型小鼠血糖和肠道菌群的影响[J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2022, 24(5):1953-1961.
- [8] 李琼,张鹏,郭晨,等. 天花粉凝集素对2型KK-Ay糖尿病小鼠血糖、血脂的调节作用[J]. *西南大学学报:自然科学版*, 2016, 38(2):182-188.
- [9] JIANDONG L, YANG Y, PENG J, et al. *Trichosanthes kirilowii* lectin ameliorates streptozocin-induced kidney injury via modulation of the balance between M1/M2 phenotype macrophage [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109:93-102.
- [10] FENG X, WANG K, CAO S, et al. Pharmacokinetics of five alkaloids and their metabolites in normal and diabetic rats after oral administration of *Rhizoma coptidis*[J]. *Planta Med*, 2022, 88(11):921-932.
- [11] SHI L L, JIA W H, ZHANG L, et al. Glucose consumption assay discovers coptisine with beneficial effect on diabetic mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 859:172523.
- [12] 冯兴中,张韦华. 菱连丸加减方辨证治疗2型糖尿病临床观察[C]//中华中医药学会(China Association of Chinese Medicine). 中华中医药学会糖尿病分会2017年学术年会暨第十八次中医糖尿病大会论文汇编. [出版者不详], 2017:1.
- [13] 马伯艳,李寒,李云凤,等. 黄连及其有效成分降糖作用的研究进展及量效关系[J]. *中成药*, 2019, 41(12):2970-2973.
- [14] KHEIRANDISH M, MAHBOOBI H, YAZDANPARAST M, et al. Challenges related to glycemic control in type 2 diabetes mellitus patients[J]. *Curr Drug Metab*, 2017, 18(2):157-162.
- [15] SONG Y, YANG J, JING W, et al. Systemic elucidation on the potential bioactive compounds and hypoglycemic mechanism of *Polygonum multiflorum* based on network pharmacology[J]. *Chin Med*, 2020, 15(1):121.
- [16] LI W, YUAN G, PAN Y, et al. Network pharmacology studies on the bioactive compounds and action mechanisms of natural products for the treatment of diabetes mellitus: A review [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8:74.
- [17] 石峻力,王旭. 基于生物信息学的糖尿病脑病关键基因与通路筛选及中药预测的研究[J]. *世界中医药*, 2022, 17(8):1057-1063.
- [18] 王逗逗. 清热药治疗2型糖尿病用药规律及其对调节肠道菌群作用机制研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2020.
- [19] 张惜燕,胡勇,邢玉瑞. 糖尿病现代中医创新病机辨析[J]. *世界中医药*, 2022, 17(4):512-515.
- [20] 赵磊,慕杨娜,梁茂新. 消渴(糖尿病)古今用药对比研究[J]. *北京中医药大学学报*, 2016, 39(9):769-773.
- [21] 邢颖,何雄,张润顺,等. 基于2843例2型糖尿病患者中医门诊处方的核心方药规律分析[J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2020, 22(9):3241-3248.
- [22] HUANG Y H, LIU G H, HSU T Y, et al. Effective dose of *rhizoma coptidis* extract granules for type 2 diabetes treatment: A hospital-based retrospective cohort study[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11:597703.
- [23] AN W, HUANG Y, CHEN S, et al. Mechanisms of *Rhizoma Coptidis* against type 2 diabetes mellitus explored by network pharmacology combined with molecular docking and experimental validation[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):20849.
- [24] YAO Y, CHEN H, YAN L, et al. Berberine alleviates type 2 diabetic symptoms by altering gut microbiota and reducing aromatic amino acids [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 131:110669.
- [25] ZHANG W, XU J H, YU T, et al. Effects of berberine and metformin on intestinal inflammation and gut microbiome composition in db/db mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118:109131.
- [26] LO H Y, LI T C, YANG T Y, et al. Hypoglycemic effects of *Trichosanthes kirilowii* and its protein constituent in diabetic mice: The involvement of insulin receptor pathway[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17(1):53.
- [27] 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.
- [28] 张颢龄,邹本良,熊伟,等. 基于肠道菌群探讨先天之本与后天之本在糖尿病发病与治疗中的作用[J]. *世界中医药*, 2021, 16(3):454-457.
- [29] 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.
- [30] YANG G, WEI J, LIU P, et al. Role of the gut microbiota in type 2 diabetes and related diseases[J]. *Metabolism*, 2021, 117:154712.
- [31] QUAN L H, ZHANG C, DONG M, et al. Myristoleic acid produced by enterococci reduces obesity through

- brown adipose tissue activation[J]. *Gut*, 2020, 69(7): 1239-1247.
- [32] RIDAURA V K, FAITH J J, REY F E, et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice [J]. *Science*, 2013, 341 (6150) : 1241214.
- [33] 周相宇,周素芳,何江艳,等. 基于肠道微生态探究参苓固肠方对妊娠期糖尿病大鼠的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(23):53-63.
- [34] NEWELL C, BOMHOF M R, REIMER R A, et al. Ketogenic diet modifies the gut microbiota in a murine model of autism spectrum disorder [J]. *Mol Autism*, 2016, 7(1):37.
- [35] YOON H S, CHO C H, YUN M S, et al. *Akkermansia muciniphila* secretes a glucagon-like peptide-1-inducing protein that improves glucose homeostasis and ameliorates metabolic disease in mice [J]. *Nat Microbiol*, 2021, 6(5):563-573.
- [36] LIU X, MAO B, GU J, et al. *Blautia*-a new functional genus with potential probiotic properties? [J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1):1-21.
- [37] ZHANG Y, WU T, LI W, et al. *Lactobacillus casei* LC89 exerts antidiabetic effects through regulating hepatic glucagon response and gut microbiota in type 2 diabetic mice [J]. *Food Funct*, 2021, 12 (18) : 8288-8299.
- [38] LI M, YUE H, WANG Y, et al. Intestinal microbes derived butyrate is related to the immunomodulatory activities of *Dendrobium officinale* polysaccharide [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 149:717-723.
- [39] GURUNG M, LI Z, YOU H, et al. Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology [J]. *EBioMedicine*, 2020, 51:102590.

[责任编辑 周冰冰]