

# 乌梅丸对 2 型糖尿病模型大鼠肠道菌群、炎症因子及短链脂肪酸的影响

周国佩<sup>1</sup>, 吴帆<sup>2</sup>, 朱金华<sup>1</sup>, 高源<sup>1</sup>, 万红娇<sup>1\*</sup>

(1. 江西中医药大学 中医学院, 南昌 330004; 2. 吉安市疾病预防控制中心, 江西 吉安 343000)

**[摘要]** 目的: 研究乌梅丸对 2 型糖尿病(T2DM)模型大鼠血糖, 肠道菌群, 肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), 白细胞介素-10(IL-10)以及肠道菌群发酵膳食纤维产生短链脂肪酸(SCFAs)的影响作用。方法: 以 80 只 SD 清洁大鼠作为实验对象, 从中随机选取 10 只为正常组, 其余 70 只以高糖高脂乳剂灌胃 8 周后联合链脲佐菌素(STZ, 35 mg·kg<sup>-1</sup>)腹腔注射建立 2 型糖尿病大鼠模型, 空腹血糖 >11.10 mmol·L<sup>-1</sup>即为造模成功。将造模未成功的大鼠剔除, 余造模成功大鼠随机分为模型组、二甲双胍组、乌梅丸高、中、低剂量组, 每组 10 只。正常组与模型组灌胃(ig)生理盐水 20 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 二甲双胍组 ig 二甲双胍 200 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 乌梅丸高、中、低剂量组分别 ig 乌梅丸 20, 10, 5 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>。造模和用药前后定期监测大鼠血糖和体质量, 用药四周后取血及大鼠粪便。16S-rDNA 高通量测序技术对肠道菌群进行基因测序, 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测大鼠血清炎症因子 TNF- $\alpha$ , IL-10 的水平, 气相色谱法检测粪便中乙酸、丙酸、正丁酸的含量。结果: 与正常组比较, 模型组体质量下降趋势明显( $P < 0.01$ ), 拟杆菌门(Bacteroidetes), 放线菌纲(Actinobacteria), 拟杆菌属(Bacteroides), 梭菌属(Clostridium)增加, 厚壁菌门(Firmicutes),  $\delta$ -变形菌纲(Deltaproteobacteria), 乳酸菌(Lactobacillus)降低, 空腹血糖、血清 TNF- $\alpha$  水平显著升高( $P < 0.01$ ), IL-10 水平下降( $P < 0.01$ ), 短链脂肪酸乙酸、丙酸、正丁酸含量降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 乌梅丸高、中、低剂量组及二甲双胍组体质量下降趋势变缓, Bacteroidetes, Actinobacteria, Bacteroides, Clostridium 降低, Firmicutes, DeltaProteobacteria, Lactobacillus 增加, 空腹血糖、血清 TNF- $\alpha$  水平下降( $P < 0.01$ ), IL-10 水平上升( $P < 0.01$ ), 乙酸、丙酸、正丁酸含量上升( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结论: 乌梅丸可能通过调节肠道菌群, 改善炎症反应, 增加短链脂肪酸的含量, 以致血糖降低, 从而达到对 2 型糖尿病的防治作用。

**[关键词]** 乌梅丸; 2 型糖尿病; 肠道菌群; 炎症因子; 短链脂肪酸

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)10-0008-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20200605

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191206.1557.007.html>

**[网络出版时间]** 2019-12-07 09:30

## Effect of Wumeiwan on Intestinal Microflora, Inflammatory Factor and Short Chain Fatty Acids in Type 2 Diabetic Rats

ZHOU Guo-pe<sup>1</sup>, WU Fan<sup>2</sup>, ZHU Jin-hua<sup>1</sup>, GAO Yuan<sup>1</sup>, WAN Hong-jiao<sup>1\*</sup>

(1. College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China;

2. Ji'an Center for Disease Control and Prevention, Ji'an 343000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effects of Wumeiwan on blood glucose, intestinal microflora, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-10 (IL-10) and dietary fiber fermented by intestinal microflora in type 2 diabetic (T2DM) rats. **Method:** Totally 80 SD clean rats were selected as experimental subjects, and 10 of them were randomly selected as the normal group. The remaining 70 rats were given high-sugar and high-fat emulsion for 8 weeks and intraperitoneally injected with streptozotocin (STZ, 35 mg·kg<sup>-1</sup>) to establish the rat model of T2DM.

**[收稿日期]** 20190909(007)

**[基金项目]** 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ170737);2018 年度江西中医药大学省级创新基金项目(YC2018-S278)

**[第一作者]** 周国佩, 在读硕士, 从事中医药与病原性研究, E-mail: 1084305016@qq.com

**[通信作者]** \* 万红娇, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中医药与病原性研究, Tel: 0791-8711816, E-mail: Ann.wan@163.com

The fasting blood glucose higher than  $11.10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  was considered as a successful model. The rats that were not successfully modeled were removed, and the remaining rats that were successfully modeled were randomly divided into model group, metformin group, high-dose Wumeiwan group, medium-dose Wumeiwan group and low-dose Wumeiwan group, with 10 rats in each group. Normal group and model group received (*ig*) normal saline ( $20 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), while metformin group (*ig* metformin  $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), Wumeiwan high, medium and low dose groups (*ig* Wumeiwan 20, 10, and  $5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) received corresponding drugs respectively. Blood glucose and body weight of rats were monitored regularly before and after administration of the drugs. Blood and feces were collected after four weeks of administration. 16S-rDNA high-throughput sequencing technology was used for gene sequencing of intestinal flora. Enzyme linked immunoassay (ELISA) was used to detect the serum levels of inflammatory factors TNF- $\alpha$  and IL-10 in rats, and the contents of acetic acid, propionic acid and butyric acid in feces were detected by gas chromatography. **Result:** As compared with the normal group, the body weight decreased significantly ( $P < 0.01$ ). Bacteroidetes, Actinobacteria, *Bacteroides*, *Clostridium* increased, Firmicutes, Deltaproteobacteria, and *Lactobacillus* decreased, fasting blood glucose and serum TNF- $\alpha$  levels increased significantly ( $P < 0.01$ ), IL-10 level decreased ( $P < 0.01$ ), and the contents of acetic acid, propionic acid and *n*-butyric acid of short-chain fatty acids decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) in model group. As compared with the model group, the body weight decreased; Bacteroidetes, Actinobacteria, *Bacteroides* and *Clostridium* decreased. Firmicutes, DeltaProteobacteria and *Lactobacillus* increased; fasting blood glucose and serum TNF- $\alpha$  decreased ( $P < 0.01$ ), and IL-10 increased ( $P < 0.01$ ), contents of acetic acid, propionic acid and *n*-butyric acid increased in Wumeiwan high-dose, medium-dose and low-dose groups and metformin group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Wumeiwan may prevent and treat T2DM by regulating intestinal flora, improving inflammatory response, increasing SCFAs content and reducing blood glucose.

[ **Key words** ] Wumeiwan; type 2 diabetes; intestinal flora; inflammatory factors; short-chain fatty acids

随着人们生活方式的改变,糖尿病患者在近几十年来急剧增加,并逐渐趋于年轻化<sup>[1]</sup>。据 2017 年国际糖尿病联盟 (IDF) 的报告中显示,现中国患糖尿病的成人数量约有 1.144 亿,已成为占全球患糖尿病人数最多的国家<sup>[2]</sup>,其中以 2 型糖尿病 (T2DM) 的患病率最高,主要以高血糖反应、胰岛素抵抗和 (或) 胰岛素分泌缺陷为特征的异质性的糖代谢性疾病,如何有效防止糖尿病成为焦点。目前 T2DM 的发病机制尚未完全清晰,近年来大量研究发现,肠道菌群与 T2DM 有着不可分割的联系。肠道菌群失调普遍存在于 T2DM 患者中,其参与 T2DM 发生的机制包括<sup>[3]</sup>慢性炎症学说、短链脂肪酸 (SCFAs) 调节机制及其他相关机制。肠道菌群失衡,导致机体免疫力下降,慢性炎症反应、能量失衡等反应发生,进而导致肥胖、胰岛素抵抗等代谢问题,最终导致 T2DM<sup>[4]</sup>。调节肠道菌群、改善炎症反应可能成为防治 T2DM 的新方向。

糖尿病在中医学中属于“消渴”范畴,临床研究表明,乌梅丸对于糖尿病胃轻瘫, T2DM 气阴两虚夹痰瘀症均有较好的疗效<sup>[5-6]</sup>。乌梅丸最早记载于汉代张仲景的《伤寒杂病论》中,研究者在对其中所记

载的乌梅丸和厥阴消渴的理论探究中发现,乌梅丸不仅仅为蛔厥所设代表方,且为治疗伤寒厥阴消渴主方,并表示乌梅丸治疗 T2DM 科学合理,效果显著<sup>[7]</sup>。全方由乌梅、人参片、附片、干姜、黄连片、桂枝、黄柏、蜀椒、细辛、当归组成,寒热刚柔并剂,攻邪与补益同时进行。目前尚缺乏对于乌梅丸如何治疗 T2DM 的机制报道,因此本研究通过对 T2DM 模型大鼠体质量、血糖、肠道菌群、炎症因子及 SCFAs 的检测,探讨乌梅丸是否通过调节肠道菌群、降低血糖,影响炎症因子释放、增加 SCFAs 含量从而达到防治 T2DM 的目的,为临床上更好地治疗 T2DM 提供实验基础。

## 1 材料

**1.1 动物** 清洁级 SD 大鼠 80 只,体质量 ( $200 \pm 20$ ) g,动物质量合格证号 SCXK (湘) 2016-0002,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供。本实验经江西中医药大学实验动物伦理委员会审查 (批准号 jzllsc2019-0013)。

**1.2 药物与试剂** 乌梅丸由原方加减:乌梅 30 g,人参片 6 g,附片 6 g,干姜 10 g,黄连片 16 g,桂枝 6 g,黄柏 6 g,蜀椒 4 g,细辛 3 g,当归 4 g。由江西中

医药大学曹岚副教授鉴定均为正品,于江西中医药大学附属医院中药房购入。先将方中药物加水浸泡 30 min,水量为煎加药材量的 8 倍,而后开始煎药,沸腾煎 40 min 纱布过滤取汁,再加药材量 6 倍的水,沸腾煎 30 min 后过滤取汁,合并 2 次水煎液于旋转蒸发仪中浓缩,药物质量浓度为  $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,置于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中备用。盐酸二甲双胍片(北京京丰制药有限公司,批号 180865);链脲佐菌素(STZ,上海源叶生物科技有限公司,批号 X21F10L81042);胆固醇,胆酸(BBI 生命科学有限公司,批号分别为 D421BA0028, E305BA0043);丙硫氧嘧啶(上海朝晖药业有限公司,批号 1702N02);粪便基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司,批号 Q5306);大鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),白细胞介素-10(IL-10)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(江苏酶免实业有限公司,批号分别为 MM-0180R1, MM-0046R1);冰乙酸、丙酸、正丁酸对照品(美国 Aladdin 公司,批号分别为 H1711034, G1827115, E1818012);罗氏血糖试纸(罗氏诊断产品有限公司,批号 24691933)。

**1.3 仪器** ACCU-CHEK Active[Model GU]型罗氏血糖仪(罗氏诊断产品有限公司);注氏 soft5 型施莱一次性采血针(苏州施莱医疗器械有限公司);MULTISKANFC 型酶标仪(美国 Thermo Forma 公司);H1650 型台式高速冷冻离心机(湘仪离心机仪器有限公司);GC2010 型气相色谱仪[岛津企业管理(中国)有限公司];7HG-G013-11 型 Zebtron ZB-WAXplus 色谱柱(天津博纳艾杰尔科技有限公司)。

## 2 方法

**2.1 建立 T2DM 模型** 从 80 只 SD 清洁级雄性大鼠中,随机选取 10 只作为正常组,正常自由饮食饮水。剩余 70 只以高糖高脂乳剂(猪油 20%,蔗糖 30%,胆固醇 10%,胆酸钠 2%,丙硫氧嘧啶 0.1%)灌胃 8 周后,腹腔注射 STZ( $35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,称取 STZ  $2 \text{ g}$ 于  $100 \text{ mL } 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中,调 pH4.0)诱导 T2DM 模型。注射 STZ 3 d 后观察大鼠饮食、尿量、体质量的变化,尾尖取血,使用血糖测量仪测量大鼠空腹血糖,血糖  $> 11.10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时则判定为 T2DM 大鼠模型<sup>[8-9]</sup>。

**2.2 分组与给药** 剔除造模未成功的大鼠,将造模成功的大鼠按随机分配的原则分为模型组、二甲双胍组、乌梅丸高、中、低剂量组,每组 10 只。正常组与模型组以生理盐水  $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃(ig),二甲双胍组以二甲双胍原药  $ig 200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,乌

梅丸高、中、低剂量组分别以乌梅丸煎剂  $ig 20, 10, 5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,给药剂量依照《中药药理研究方法学(第 3 版)》中“人和动物体表面积折算等效剂量比值表换算”)。用药 4 周测大鼠空腹血糖后处理取材检测。

## 2.3 指标检测

**2.3.1 血糖和体质量的测定** 在 SD 大鼠造模前、造模后、用药后各时段进行空腹血糖的监测,大鼠禁食不禁水 12 h,尾尖血管部取血,使用罗氏血糖仪检测并记录。SD 大鼠适应性喂养 7 d 后,开始灌胃高脂高糖乳剂,每两周测量 1 次体质量,观察体质量增减情况,并做好记录。

**2.3.2 ELISA 检测大鼠血清 TNF- $\alpha$ , IL-10 的含量** 股动脉取血  $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min 取上清,严格按照 TNF- $\alpha$ , IL-10 试剂盒说明书进行检测。

## 2.3.3 气相色谱检测乙酸、丙酸、正丁酸含量

**2.3.3.1 色谱条件** 色谱柱:ZB-WAXplus 毛细管柱( $0.25 \text{ mm} \times 30 \text{ m} \times 0.25 \text{ }\mu\text{m}$ );进样口温度  $250 \text{ }^\circ\text{C}$ ;载气为氮气,纯度  $\geq 99.999\%$ ;载气流速  $3.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ;进样方式分流进样;分流比 50:1,进样量为  $1 \text{ }\mu\text{L}$ ;检测器温度(FID)  $250 \text{ }^\circ\text{C}$ ;升温程序  $80 \text{ }^\circ\text{C}, 10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}, 180 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

**2.3.3.2 标准曲线的制备** 取乙酸对照品  $47.71 \text{ }\mu\text{L}$ ,丙酸对照品  $50.33 \text{ }\mu\text{L}$ ,正丁酸对照品  $51.87 \text{ }\mu\text{L}$ ,定容至  $5 \text{ mL}$ ,制成  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的母液。吸取母液  $500 \text{ }\mu\text{L}$ 用甲醇定容至  $5 \text{ mL}$ ,制成  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。分别取质量浓度为  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的液体  $3.75, 2.5, 1.25, 1, 0.5, 0.25 \text{ mL}$ ,均用甲醇溶液定容至  $5 \text{ mL}$ ,分别制成质量浓度为  $750, 500, 250, 100, 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混标,上机检测。根据乙酸、丙酸、正丁酸的浓度及峰面积关系绘制标准曲线。

**2.3.3.3 样品的制备** 每只大鼠取粪便  $0.2 \text{ g}$ 于无菌离心管内,加入甲醇溶液  $1 \text{ mL}$ 静置 10 min,振荡混匀成粪便悬液。再用浓硫酸使其 pH 调节至  $2 \sim 3$ ,静置 5 min,其间振荡混匀数次。离心机  $5\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min 后,取上清再  $5\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取上清上机检测。

## 2.3.4 16S-rDNA 测序

**2.3.4.1 大鼠粪便 DNA 的提取** 使用无菌离心管及无菌镊子进行操作,镊取大鼠新鲜粪便,切取  $180 \text{ g}$ 左右置于无菌离心管中,加入缓冲液 GSL  $1.5 \text{ mL}$ 混匀,置于  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 5 min。涡旋 15 s 后进行离心( $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}, 5 \text{ min}$ ,下同)。取上清液  $1.2 \text{ mL}$ ,放入抑制剂吸附片 InhibitEX,振荡 5 min,

再 37 °C 孵育 1 min 后离心取上清,将上清液再次离心。吸取上清液 200 μL,加入 ProteinaseK 15 μL。在离心管中加入缓冲液 GB 200 μL,涡旋后 70 °C 孵育 10 min。加入无水乙醇 200 μL,离心。将吸附柱放入收集管中,将上一步所得溶液加入到一个吸附柱 CR2 中,12 000 r·min<sup>-1</sup>离心 2 min,倒掉废液后将吸附柱 CR2 放入收集管中。向吸附柱 CR2 中加入缓冲液 GD 500 μL,缓冲液 GD 使用前加入无水乙醇,12 000 r·min<sup>-1</sup>离心 30 s,倒掉废液后,加入漂洗液 PW 600 μL,使用漂洗液 PW 前加入无水乙醇,再一次 12 000 r·min<sup>-1</sup>离心 30 s,去除废液。重复再次漂洗,离心,倒掉废液。将吸附柱 CR2 放回收集管中离心(12 000 r·min<sup>-1</sup>,3 min),室温放置风干,再将吸附柱 CR2 转入一个无菌离心管中,向吸附材料的中央部位悬空滴加洗脱缓冲液 TB 60 μL,室温放置 5 min 后离心,将收集到的溶液放入新的离心管中。放入 -20 °C 冰箱保存,尽快进行下一步检测。

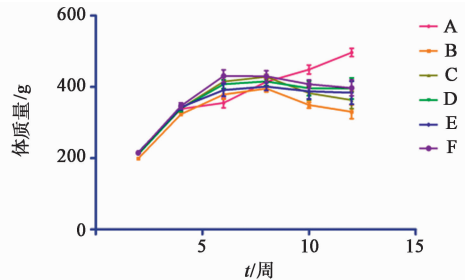
**2.3.4.2 大鼠粪便 16S-rDNA 测序** 提取粪便 DNA 样品后,对样品进行检测,对其进行总 DNA 质检。使用 5% TBE 缓冲液配置 10% 琼脂糖凝胶,每孔分别上样 3 μL 以 100 V 电压跑电泳 50 min,用紫外微量分光光度计进行质检。将大鼠粪便 DNA 送至华大基因公司检测,使用软件将 reads 之间的 overlap 关系使 reads 拼接成 Tags,检测粪便样品总计得到 736 805 条 Tags,平均每个样品 61 400 条;Tag 平均长度为 252 bp,SD 值为 0 bp。对原始数据进行 QC,将拼接成的 Tags 按照丰度从大到小排序;75% 相似度下将 Tags 聚成 OTU,选择相应的数据库进行聚集制备和测序,对其进行物种注释及组间物种差异分析,然后通过对 OTU 注释完成 OTU 的物种分类。

**2.4 统计学分析** 采用 SPSS 19.0 统计软件对实验数据进行处理分析,用  $\bar{x} \pm s$  表示数据,多组间比较且方差齐性数据采用单因素方差分析,不同受试对象进行不同处理后数据采用独立样本 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 T2DM 大鼠体质量的影响** 正常组大鼠皮毛光亮,精神状态活跃,饮食饮水正常,体质量呈稳态上升;灌胃高脂高糖乳剂大鼠皮毛泛黄,精神欠佳,喜睡懒动,体质量增长显著高于正常组;注射 STZ 造模后,出现明显多饮、多食、多尿的现象,垫料湿度明显增加,体质量也出现下降趋势,造模后模型组体质量显著低于正常组;用药后,乌梅丸高、中、低

剂量组、二甲双胍组大鼠多饮多食多尿现象较模型组有明显缓解,体质量下降趋势较模型组趋缓,体质量高于模型组。见图 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 二甲双胍组;D. 乌梅丸高剂量组;E. 乌梅丸中剂量组;F. 乌梅丸低剂量组(图 4,5 同)

图 1 乌梅丸对 T2DM 大鼠体质量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig.1 Effect of Wumeiwan on body weight of T2DM rats( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

**3.2 对 T2DM 大鼠血糖的影响** 造模前,大鼠空腹血糖均属于正常范围;造模后,大鼠血糖  $> 11.10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,与正常组比较,模型组血糖显著升高( $P < 0.01$ );各组用药后,与模型组比较,乌梅丸高、中、低剂量组及二甲双胍组用药后血糖明显下降( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 乌梅丸对 T2DM 大鼠血糖的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

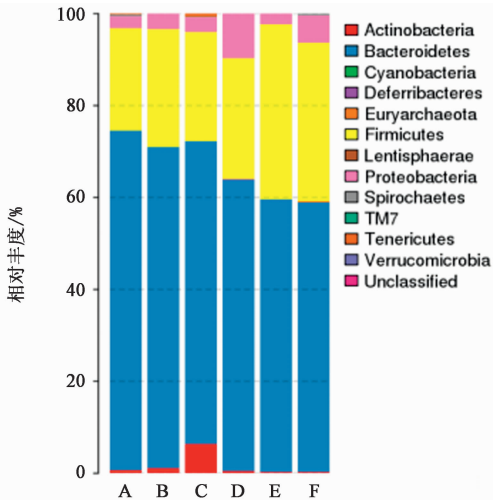
Table 1 Effect of Wumeiwan on on FPG in T2DM rats( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	造模前	造模后	用药后
正常	-	5.10 ± 0.67	4.90 ± 0.59	4.40 ± 0.65
模型	-	4.86 ± 0.57	22.98 ± 5.48 <sup>2)</sup>	21.64 ± 5.43
二甲双胍	0.2	4.84 ± 0.52	21.43 ± 7.11 <sup>2)</sup>	13.98 ± 7.61 <sup>4)</sup>
乌梅丸	20	4.40 ± 0.84	20.68 ± 5.90 <sup>2)</sup>	12.94 ± 6.85 <sup>3)</sup>
	10	4.16 ± 0.75	20.50 ± 6.82 <sup>2)</sup>	12.05 ± 5.23 <sup>4)</sup>
	5	4.76 ± 0.70	17.49 ± 6.23 <sup>2)</sup>	11.43 ± 5.15 <sup>4)</sup>

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

### 3.3 对肠道菌群多样性的影响(物种注释分析)

**3.3.1 样品 Phylum 分类水平中物种分析** 与正常组比较,模型组拟杆菌门(Bacteroidetes)数量增加,厚壁菌门(Firmicutes),变形菌门(Proteobacteria)丰度减少;与模型组比较,乌梅丸高、中、低剂量组 Bacteroidetes 数量均减少, Firmicutes 增加, Proteobacteria 乌梅丸高、低剂量组增加,二甲双胍组、乌梅丸中剂量组数量减少。模型组和乌梅丸高剂量组检测样品中未有 TM7 菌门出现,正常组、二甲双胍组、乌梅丸中、低剂量组均检测出 TM7 菌门。见图 2。



A. 二甲双胍组; B. 模型组; C. 乌梅丸低剂量组; D. 乌梅丸高剂量组; E. 乌梅丸中剂量组; F. 正常组 (图 3 同)

图 2 样品 Phylum 分类水平中物种 Profiling 柱状

Fig. 2 Spectral histogram of sample phylum classification level

**3.3.2 样品 Class 分类水平中物种分析** 与正常组比较,模型组放线菌纲 (Actinobacteria) 数量增加,  $\delta$ -变形菌纲 (Deltaproteobacteria) 数量明显减少;与模型组比较,Actinobacteria 数量在二甲双胍组、乌梅丸高、中剂量组中明显减少,乌梅丸中剂量组中升高,Deltaproteobacteria 数量在二甲双胍组及乌梅丸高、中组明显增多。见图 3。

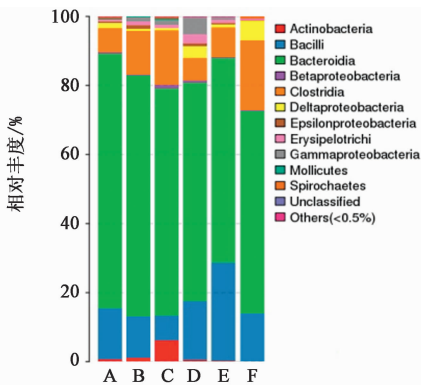


图 3 样品 Class 分类水平中物种 Profiling 柱状

Fig. 3 Spectral histogram of sample Class classification level

**3.3.3 样品 Genus 分类水平中物种分析** 与正常组比较,模型组拟杆菌属 (*Bacteroides*),梭菌属 (*Clostridium*),普雷沃氏菌属 (*Prevotella*) 丰度均增加,乳酸菌 (*Lactobacillus*) 丰度明显降低;与模型组比较,二甲双胍组及乌梅丸高、中、低剂量组 *Bacteroides*, *Clostridium* 占比均有不同程度的减少,二甲双胍组 *Prevotella* 丰度明显降低,乌梅丸各组 *Lactobacillus* 丰度上升。见图 4。

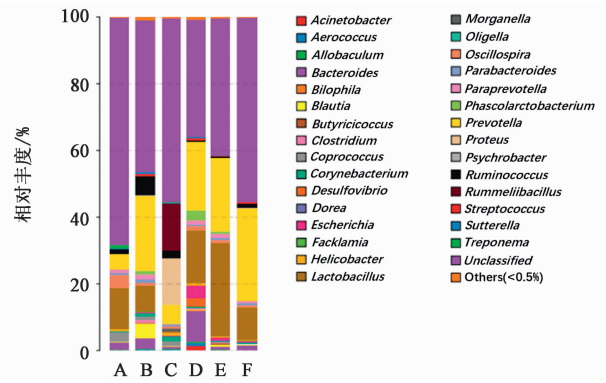


图 4 样品 Genus 分类水平中物种 Profiling 柱状

Fig. 4 Spectral histogram of sample Genus classification level

**3.4 对 T2DM 大鼠炎症因子 TNF- $\alpha$ , IL-10 的影响** 与正常组比较,模型组血清 TNF- $\alpha$  水平显著上升,IL-10 水平显著减少 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较,乌梅丸高、中、低剂量组,二甲双胍组血清 TNF- $\alpha$  水平明显下降,IL-10 水平明显上升 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 乌梅丸对 T2DM 大鼠血清 TNF- $\alpha$ , IL-10 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Table 2 Effect of Wumeiwan on serum TNF- $\alpha$  and IL-10 levels in T2DM rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	TNF- $\alpha$	IL-10
正常	-	227.25 $\pm$ 27.24	97.53 $\pm$ 8.88
模型	-	388.89 $\pm$ 26.17 <sup>2)</sup>	60.45 $\pm$ 2.39 <sup>2)</sup>
二甲双胍	0.2	348.14 $\pm$ 35.18 <sup>4)</sup>	71.88 $\pm$ 13.09 <sup>3)</sup>
乌梅丸	20	290.34 $\pm$ 18.45 <sup>4)</sup>	67.69 $\pm$ 15.02 <sup>4)</sup>
	10	330.07 $\pm$ 30.86 <sup>4)</sup>	76.97 $\pm$ 5.60 <sup>4)</sup>
	5	318.93 $\pm$ 30.39 <sup>4)</sup>	71.88 $\pm$ 8.23 <sup>4)</sup>

**3.5 对 T2DM 模型大鼠 SCFAs 的影响**

**3.5.1 标准曲线** 按 2.3.3.2 项的方法,以峰面积 ( $\mu\text{V} \times \text{min}$ ) 为纵坐标,以乙酸、丙酸、正丁酸的浓度 ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 作为横坐标。分别求得乙酸、丙酸、正丁酸标准品的线性回归方程及相关系数。见表 3。

表 3 SCFAs 的线性回归方程与相关系数

Table 3 Linear regression equation and correlation coefficient of SCFAs

成分	线性方程	$R^2$
乙酸	$Y = 414.22X - 10\ 553$	0.996 4
丙酸	$Y = 782.42X - 10\ 124$	0.995 2
正丁酸	$Y = 1\ 003.2X - 7\ 344.7$	0.997 5

**3.5.2 对 T2DM 模型大鼠 SCFAs 的影响** 与正常组比较,模型组乙酸、丙酸、正丁酸含量均明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ );与模型组比较,二甲双胍组和乌梅丸高、中、低剂量组,乙酸、丙酸、正丁酸含量均明显增加 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 4,图 5。

表 4 乌梅丸对 T2DM 模型大鼠 SCFAs 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 4 Effect of Wumeiwan on SCFAs in T2DM model rats ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	乙酸	丙酸	正丁酸
正常	-	3.00 ± 0.56	0.97 ± 0.24	0.66 ± 0.13
模型	-	1.42 ± 0.16 <sup>2)</sup>	0.54 ± 0.04 <sup>1)</sup>	0.37 ± 0.11 <sup>1)</sup>
二甲双胍	0.2	4.23 ± 0.31 <sup>4)</sup>	1.67 ± 0.40 <sup>4)</sup>	0.71 ± 0.09 <sup>3)</sup>
乌梅丸	20	2.09 ± 0.04 <sup>4)</sup>	0.89 ± 0.16 <sup>3)</sup>	0.68 ± 0.15 <sup>3)</sup>
	10	2.95 ± 0.21 <sup>4)</sup>	1.35 ± 0.03 <sup>4)</sup>	1.05 ± 0.26 <sup>3)</sup>
	5	1.85 ± 0.04 <sup>4)</sup>	1.05 ± 0.22 <sup>3)</sup>	0.71 ± 0.16 <sup>3)</sup>

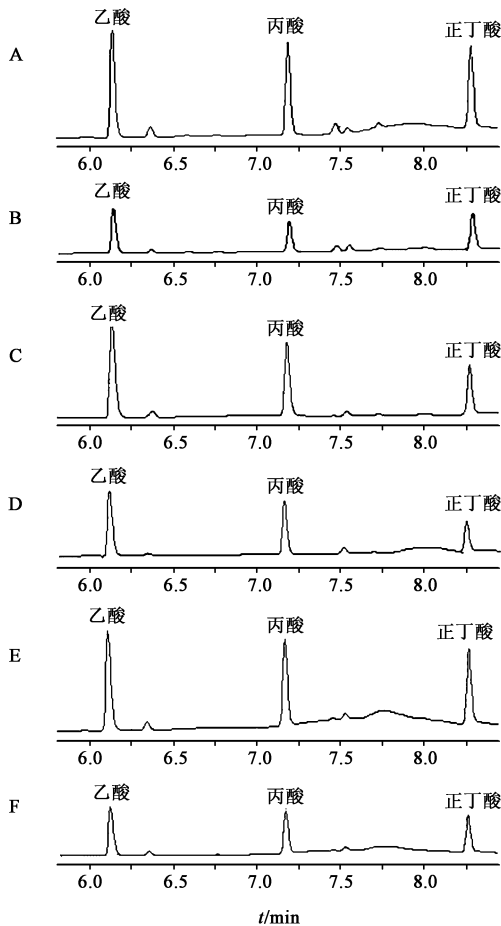


图 5 各组大鼠粪便中 SCFAs GC  
Fig. 5 Gas chromatogram of SCFAs in faeces of rats in each group

#### 4 讨论

《黄帝内经·灵枢·五变篇》所言“五脏者,主藏

精者也,五脏之血气皆少,则津液枯竭,而为消瘵”,说明消渴病的发生与五脏相关,其基本病机多为气阴两虚,燥热伤津,病位在五脏<sup>[10]</sup>,以多饮、多食、多尿及消瘦为主要临床表现。消渴日久,脾胃气虚,阴阳俱虚,寒热错杂,变证百出。乌梅丸重用酸甘之乌梅为君以敛肝泄肝,臣以蜀椒、细辛温肾暖脾,黄连片、黄柏清热除燥,附片、干姜、桂枝均助蜀椒、细辛温肾暖脾之效,人参片、当归气血双补。全方寒热并用、刚柔并济、攻补兼施,对于治疗消渴日久,上热下寒的 T2DM 有充分的中医理论依据。且大量临床及实验研究证实,乌梅丸在降低血糖,改善胰岛素抵抗,刺激  $\beta$  细胞分泌胰岛素,降血脂,改善微循环,改善神经功能及提高神经传导速度,改善一般情况,提高患者生活质量等方面均有重要的作用<sup>[11]</sup>。现代药理研究表明,乌梅具有一定的降血糖效果;黄连、黄柏中所含小檗碱能够降低血糖,其原理主要为黄连素能促进胰岛 B 细胞的修复;人参对胰岛素的分泌有促进作用,能够增强胰岛素的敏感性,增加对糖的利用率,从而减缓肠道对葡萄糖的吸收;细辛能改善糖尿病患者的血糖与血流情况<sup>[12-15]</sup>。且研究表明黄连可有效地降低 T2DM 大鼠血清中的 TNF- $\alpha$  水平,对炎症反应加以抑制,进而使胰岛素抵抗状态得到改善,达到降低血糖的作用。故将乌梅丸用于 T2DM 有充分的药理基础<sup>[16]</sup>。

肠道菌群是目前研究的主要热点之一,肠道中多种微生物之间的稳态是维持机体生理功能稳态的重要原因之一。肠道菌群紊乱,将会引起机体神经、免疫、代谢等多种问题。肠道菌门主要由四大类菌门组成,其中厚壁菌门与拟杆菌门占主导,以及变形菌门及放线菌门<sup>[17]</sup>。王瑾等<sup>[18]</sup>对 T2DM 模型大鼠肠道菌群检测显示大鼠出现明显的肠道菌群紊乱,包括下调拟杆菌门,厚壁菌门,上调变形菌门,放线菌门。LARSEN 等<sup>[19]</sup>研究显示,T2DM 患者以厚壁菌门/拟杆菌门比例降低最为明显,而一些致病菌(梭菌属、大肠埃希菌属)则显著增加,且菌群的变化程度与血糖浓度息息相关。QIN 等<sup>[20]</sup>发现,T2DM 患者肠道菌群的失衡主要表现为罗氏菌属等产丁酸类有益菌大量丢失,而梭菌等有害菌数目增多。有益菌减少,有害菌增加,导致机体代谢紊乱、免疫功能异常、能量失衡等一些列问题,引起胰岛素抵抗和血糖升高。

T2DM 是以全身慢性低度炎症为特征的代谢性疾病。肠道菌群改变,增加肠壁通透性,致内毒素进入血液后,引起炎症因子释放,导致全身慢性炎症反

应,最终导致胰岛素抵抗是肠道菌群作用于 T2DM 的机制之一。TNF- $\alpha$  作为重要的炎性因子之一,是由单核细胞、巨噬细胞等分泌合成的非糖基化蛋白的一种,对炎症反应具有促进作用。研究证明,TNF- $\alpha$  能抑制脂肪、肌肉上的葡萄糖转运蛋白,影响葡萄糖代谢通路,引起高胰岛素血症,且 TNF- $\alpha$  会抑制胰岛素依赖的葡萄糖转运,参与胰岛素抵抗机制的发生,与 T2DM 的发生有着密不可分的关系<sup>[21-22]</sup>。IL-10 作为重要的抗炎因子,在免疫调节及对炎症的调控方面均扮演着重要的角色。实验结果显示,NOD 鼠发生糖尿病时,IL-10 水平显著下降,而在注射 IL-10 表达质粒后,糖尿病发生率显著降低<sup>[23]</sup>。王想<sup>[24]</sup> 研究显示,低水平 IL-10 与高血糖、高糖化血红蛋白具有相关性,可能对 T2DM 的发病具有保护作用。

SCFAs 为肠道菌群催化多糖代谢的产物,主要包括乙酸、丙酸和正丁酸。大量实验研究表明,SCFAs 与 T2DM 之间存在着一定的联系。杨晓庆等<sup>[25]</sup> 发现糖尿病组小鼠粪便中乙酸、丙酸、正丁酸的含量明显低于正常组及高脂组;经过降糖治疗后,糖尿病小鼠粪便中乙酸、丙酸、正丁酸的含量明显上升。LIN 等<sup>[26]</sup> 发现用丁酸、丙酸和乙酸盐可以预防高脂引起的小鼠肥胖和胰岛素抵抗。乙酸和丙酸是糖异生和脂肪生成过程中重要的底物,乙酸能够刺激胰岛  $\beta$  细胞分泌胰岛素丙酸会抑制胆固醇的合成,降低血脂;丁酸是肠上皮细胞的主要能量源,对于维持能量平衡和保持胰岛素敏感性具有帮助作用,且丁酸能够抑制 TNF- $\alpha$  的释放,增加 IL-10 的表达<sup>[27-28]</sup>。

本实验通过对 T2DM 模型大鼠体质量、血糖、肠道菌群、炎性因子(TNF- $\alpha$ , IL-10)和 SCFAs 实验指标的检测,与正常组比较,造模后模型组的血糖明显高于正常组,体质量下降趋势显著, Firmicutes/Bacteroides, DeltaProteobacteria, Lactobacillus 明显降低, Bacteroidetes, Clostridium 等致病有害菌丰度增加,促炎因子 TNF- $\alpha$  水平增加,抗炎因子 IL-10 水平降低,乙酸、丙酸、正丁酸含量均下降显著。在给予二甲双胍及乌梅丸高、中、低剂量给药后,与模型组比较,用药组血糖降低,体质量下降趋势变缓, Firmicutes/Bacteroides, DeltaProteobacteria, Lactobacillus 丰度均有所增加, Bacteroidetes, Clostridium 丰度降低, TNF- $\alpha$  水平下降, IL-10 水平上升,乙酸、丙酸、正丁酸含量均有所升高,证明了乌梅丸能够调节 T2DM 模型大鼠肠道菌群、降低血糖、

改善炎症反应,增加 SCFAs 的含量,从而改善 T2DM 的病情,为研究乌梅丸治疗 T2DM 作用机制提供实验基础。乌梅丸调节肠道菌群防治 T2DM 的作用机制仍未清晰,需进一步研究。

[参考文献]

- [1] AGUIREE F, BROWN A, CHO N H, et al. *IDF diabetes atlas: Sixth edition* [M]. Brussels: International Diabetes Federation, 2013.
- [2] 董海蕴, 张文阳, 陆玮. 营养干预对门诊 2 型糖尿病运动疗法患者效果的调查 [J]. 中华全科医学, 2019, 17(7): 1201-1203, 1212.
- [3] 陈诚, 陆明, 夏娟, 等. 肠道菌群与 2 型糖尿病关系的研究进展 [J]. 医学综述, 2017, 23(15): 3072-3076.
- [4] 冯玲, 杨凡. 肠道菌群与肥胖及胰岛素抵抗的关系 [J]. 中国儿童保健杂志, 2013, 21(8): 826-828.
- [5] 李静. 乌梅丸加减方治疗糖尿病胃轻瘫的临床观察 [J]. 光明中医, 2018, 33(22): 3355-3357.
- [6] 黄洁桦, 邓小敏, 陈聪, 等. 乌梅丸合八珍汤加减治疗肥胖 2 型糖尿病气阴两虚夹痰瘀证临床观察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(16): 56-60.
- [7] 任爱华, 阚方旭. 从乌梅丸组方特色探治疗糖尿病之机理 [C] // 第四届国际中医糖尿病大会论文集汇编, 北京, 2009: 378.
- [8] 陈瑞, 马宁宁, 范姗姗, 等. 基于代谢组学分析金芪降糖片改善 2 型糖尿病大鼠脂代谢紊乱的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(20): 102-107.
- [9] 吴帆, 刘圣徽, 万红娇, 等. 乌梅丸对 2 型糖尿病模型大鼠 NF- $\kappa$ B p65 及 GLP-1 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(21): 144-148.
- [10] 黄洁桦, 邓小敏, 陈聪, 等. 乌梅丸合八珍汤加减治疗肥胖 2 型糖尿病气阴两虚夹痰瘀证临床观察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(16): 56-60.
- [11] 曾晓虹. 乌梅丸加减治疗糖尿病及其并发症的研究近况 [J]. 广西中医药大学学报, 2017, 20(3): 62-64.
- [12] 赵伟鹏, 姜欣, 黄金昶, 等. 加味乌梅丸抑制非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷小鼠胰腺癌移植瘤的蛋白组学研究 [J]. 安徽中医药大学学报, 2015, 34(3): 72-78.
- [13] 王利红, 唐文照, 辛义周. 黄连中生物碱成分及药理作用研究进展 [J]. 山东中医药大学学报, 2015, 39(4): 389-392.
- [14] 薛涛, 夏朝霞, 邬丽莎, 等. 人参降糖作用的研究进展 [J]. 中国现代中药, 2014, 16(5): 428-432.
- [15] 黄小燕, 党翠芝, 杨庆雄. 灯盏细辛提取物治疗 2 型糖尿病高脂血症大鼠的研究 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(4): 847-849.
- [16] 沈洁, 周珊珊, 万晓刚. 黄连对 2 型糖尿病大鼠胰腺

- 内质网应激 PERK/ATF4/CHOP 信号通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(16): 50-55.
- [17] 曹莞婷, 范一宏, 吕宾. 肠道菌群对炎症性肠病诊断的研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2019, 27(3): 190-196.
- [18] 王瑾, 冉倩, 王琳, 等. 基于 16S rRNA 技术分析黄连酒蒸前后对正常及 2 型糖尿病大鼠肠道微生物的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(22): 92-102.
- [19] LARSEN N, VOGENSEN F K, FW D B V, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults [J]. PLoS One, 2010, 5(2): e9085.
- [20] 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.
- [21] 聂益军, 吴红. P2X<sub>7</sub> 受体、TNF- $\alpha$ 、IL-10 及 IL-1 $\beta$  与 2 型糖尿病的相关性研究 [J]. 实验与检验医学, 2015, 33(4): 410-413.
- [22] 王焯, 朱向东. 葛根苓连汤对 2 型糖尿病 ZDF 大鼠 CRP, TNF- $\alpha$ , IL-6 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(21): 130-134.
- [23] 卢斌, 卢大儒, 邹大进. 白细胞介素-10 基因对非肥胖糖尿病鼠 1 型糖尿病发病率的影响 [J]. 中国临床康复, 2005, 9(3): 98-100.
- [24] 王想. 2 型糖尿病患者血清 IL-10 及 TNF- $\alpha$  表达对血管病变的影响 [J]. 中国实用神经疾病杂志, 2012, 15(1): 63-64.
- [25] 杨晓庆, 李琳琳, 王焯. 小鼠肠道菌群代谢产物与糖尿病的相关性研究 [J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(2): 134-136.
- [26] LIN H V, RASSETTO A, KOWALIK E J J, et al. Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms [J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35240.
- [27] 崔祥, 陶金华, 江曙, 等. 肠道菌群与 2 型糖尿病相关性的研究进展 [J]. 中国微生态学杂志, 2017, 29(11): 1346-1349.
- [28] 李琳琳, 王焯. 肠道微生态与 2 型糖尿病的发生和发展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016, 30(5): 4834-4890.

[责任编辑 周冰冰]