

· 药剂与炮制 ·

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

王瑾¹, 冉倩¹, 王琳¹, 胡昌江¹, 黄勤挽^{1*}, 张海²

(1. 成都中医药大学 药学院, 国家中医药管理局 中药炮制技术重点研究室, 成都 611137;

2. 雅安迅康药业有限公司, 四川 雅安 625600)

[摘要] 目的: 基于 16S rRNA 技术研究黄连酒蒸前后对正常和 2 型糖尿病大鼠肠道菌群的影响, 从肠道菌群的角度探讨黄连酒蒸炮制“减毒增效”的原理。方法: 采用高脂饮食结合链脉佐菌素复制 2 型糖尿病大鼠模型。正常和模型大鼠分别按 $0.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (按生药量计) 每天灌胃生黄连生品或酒蒸黄连水煎液, 阳性药组按 $0.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 每天灌胃二甲双胍溶液, 连续给药 30 d。每周测 1 次血糖, 于给药第 27 天进行口服糖耐量的测定。于第 30 天取粪便后麻醉大鼠, 取血进行酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测, 解剖取结肠进行苏木精-伊红 (HE) 染色。基于 16S rRNA 基因测序技术对各个组大鼠肠道菌群的 alpha 多样性, beta 多样性, 菌群丰度及构成, 及其与抗炎抗氧化的相关性等进行综合评价。结果: 正常大鼠给予黄连生品或酒蒸黄连后, 出现了一定的炎性反应, 氧化-抗氧化系统失衡, 结肠病理性损伤以及肠道菌群改变, 表现出了一定的毒副作用, 但酒蒸黄连的毒副作用低于生黄连。黄连酒蒸前后均能降低 2 型糖尿病大鼠的空腹血糖以及提高糖耐量, 虽然酒蒸后作用有增强的趋势, 但酒蒸前后无显著差异。2 型糖尿病大鼠出现轻度的炎症反应和氧化-抗氧化系统失衡, 表现为白细胞介素 (IL)-6, 核转录因子 (NF)- κ B 和丙二醛 (MDA) 含量显著升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px), 还原型谷胱甘肽 (GSH), 超氧化物歧化酶 (SOD), 过氧化氢酶 (CAT) 活力明显降低 ($P < 0.01$), 黄连酒蒸前后均能抑制炎症反应以及氧化-抗氧化系统失衡, 且酒蒸黄连作用优于黄连生品; 2 型糖尿病大鼠出现明显的结肠病理性损伤, 而黄连酒蒸前后均能减轻这种改变, 且酒蒸黄连作用优于生黄连。2 型糖尿病大鼠出现明显的肠道菌群紊乱, 包括下调拟杆菌门 (Bacteroidetes), 厚壁菌门 (Firmicutes) 和 Kiritimatiellaeota, 上调变形菌门 (Proteobacteria), 放线菌门 (Actinobacteria), 酸杆菌门 (Acidobacteria), 绿弯菌门 (Chloroflexi), 蓝细菌门 (Cyanobacteria) 和疣微菌门 (Verrucomicrobia), 黄连酒蒸前后均能减轻肠道菌群紊乱, 且黄连对 Kiritimatiellaeota, Cyanobacteria 和 Verrucomicrobia 的调节作用强于酒蒸黄连, 酒蒸黄连可以显著降低 Chloroflexi 水平, 而黄连生品无此作用。肠道菌群可能与黄连酒蒸前后的抗氧化能力具有一定的相关性。结论: 黄连酒蒸前后可通过调节肠道菌群而对 2 型糖尿病大鼠起到治疗作用, 且酒蒸黄连疗效更佳; 黄连酒蒸后对肠道菌群的“毒副作用”降低。黄连酒蒸“减毒增效”的炮制机制与肠道菌群密切相关。

[关键词] 黄连; 生品; 酒蒸品; 16S rRNA 技术; 2 型糖尿病; 肠道微生物; 抗氧化活性

[中图分类号] R22; R28; C37; R943.1; TS193 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)22-0092-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192447

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190904.0923.001.html>

[网络出版时间] 2019-09-04 13:56

Effect of Coptidis Rhizoma on Gut Microbiota of Normal and Type 2 Diabetic Rats Before and After Being Steamed with Rice Wine Based on 16S rRNA Technique

WANG Jin¹, RAN Qian¹, WANG Lin¹, HU Chang-jiang¹, HUANG Qin-wan^{1*}, ZHANG Hai²

(1. Key Laboratory of Technology of Chinese Medicine Processing, National Administration of Traditional Chinese Medicine (TCM), School of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China;

2. Ya'an Xunkang Pharmaceutical Co. Ltd., Ya'an 625600, China)

[收稿日期] 20190807(003)

[基金项目] 四川省中医药管理局中医药基础研究项目(2018JC011); 成都市科技局科技惠民技术研发项目(2015-HM01-00401-SF)

[第一作者] 王瑾, 在读博士, 助理研究员, 从事中药炮制研究, E-mail: wangjin0816@126.com

[通信作者] * 黄勤挽, 博士, 教授, 从事中药炮制研究, Tel: 028-61800231, E-mail: huangqinwan@cdutcm.edu.cn

[Abstract] Objective: To investigate the effect of *Coptidis Rhizoma* on intestinal microflora of normal and type 2 diabetic rats before and after being steamed with rice wine based on 16S rRNA sequencing technology. **Method:** The type 2 diabetic rat model was established by high-fat diet and streptozotocin. Normal and model rats were given the decoction of *Coptidis Rhizoma* or *Coptidis Rhizoma* steamed with rice wine every day ($0.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, according to raw drug quantity), the positive drug group was given metformin solution every day ($0.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), continuous administration for 30 d. Blood glucose was measured once a week and oral glucose tolerance was measured on the 27th day of administration. On the 30th day, feces were taken and the rats were anesthetized. Blood was taken for enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Colon was dissected for hematoxylin-eosin (HE) staining. Based on 16S rRNA gene sequencing technology, the alpha diversity, beta diversity, abundance and composition, and the correlation with anti-inflammatory and antioxidant activities of intestinal microflora were comprehensively analyzed and evaluated. **Result:** After giving normal rats *Coptidis Rhizoma* or *Coptidis Rhizoma* steamed with rice wine, there were some inflammatory reactions, imbalance of oxidation-antioxidant system, pathological damage of colon and changes of intestinal microflora, which showed some toxic and side effects, but the toxic and side effects of *Coptidis Rhizoma* steamed with rice wine were lower than those of *Coptidis Rhizoma*. *Coptidis Rhizoma* could reduce fasting blood glucose and improve glucose tolerance in type 2 diabetic rats before and after steaming. Although the effect of *Coptidis Rhizoma* steamed with rice wine had an increasing trend, there was no significant difference between before and after processing. Type 2 diabetic rats appeared mild inflammation and imbalance of oxidation-antioxidant system, characterized by significant increase of contents of interleukin (IL) -6, nuclear transcription factor (NF) - κ B and malondialdehyde (MDA) ($P < 0.05$, $P < 0.01$), significant decrease of glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and reduced glutathione (GSH) activities ($P < 0.01$). *Coptidis Rhizoma* could inhibit inflammation and imbalance of oxidation-antioxidant system, and alleviate pathological damage of colon before and after steaming in type 2 diabetic rats, the effect of *Coptidis Rhizoma* steamed with rice wine was better than that of *Coptidis Rhizoma*. Significant intestinal flora disorders were observed in type 2 diabetic rats, including down-regulation of Bacteroidetes, Firmicutes and Kiritimatiellaeota, up-regulation of Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi, Cyanobacteria and Verrucomicrobia. *Coptidis Rhizoma* could alleviate intestinal microflora disturbance before and after steaming, and the regulation effect of *Coptidis Rhizoma* on Kiritimatiellaeota, Cyanobacteria and Verrucomicrobia was stronger than that of *Coptidis Rhizoma* steamed with rice wine. *Coptidis Rhizoma* steamed with rice wine could significantly reduce the level of Chloroflexi, but *Coptidis Rhizoma* had no such effect. The intestinal microflora may be correlated with the antioxidant capacity of *Coptidis Rhizoma* before and after steaming. **Conclusion:** *Coptidis Rhizoma* can treat type 2 diabetic rats by regulating intestinal microflora before and after steaming with rice wine, and the effect of *Coptidis Rhizoma* steamed with rice wine is better. The toxic and side effects of *Coptidis Rhizoma* on intestinal flora are reduced by steamed with rice wine. The processing mechanism of increasing efficacy and decreasing toxicity of *Coptidis Rhizoma* steamed with rice wine is closely related to intestinal microflora.

[Key words] *Coptidis Rhizoma*; raw products; steamed products; 16S rRNA technique; type 2 diabetes mellitus; intestinal microflora; antioxidant activity

糖尿病是难以治愈的代谢性疾病,在全世界影响约 4 亿人^[1],中国是糖尿病患者人数最多的国家^[2],其中 2 型糖尿病(T2DM)约占糖尿病发病人数的 95%^[3-4]。肠道菌群是人体内最大的微生态系统,对人体的物质代谢和能量代谢有着重要影响,调节肠道微生物群可改善糖尿病葡萄糖耐受不良并改

变炎症和机体代谢状态^[5]。因此,肠道微生物群越来越被认为是一个可干预目标,在 T2DM 的治疗和预防方面具有重要潜力。

黄连为毛茛科植物黄连、三角叶黄连或云连的干燥根茎。早在魏晋时《名医别录》就有黄连主消渴的记载。黄连大苦大寒极易伤阴,以大热的酒制

之,可缓和其苦寒之性,提高黄连治疗 T2DM 的临床适用性。《本草纲目》记载“治消渴,用酒蒸黄连”。清代《本经逢原》曰“治消渴用酒蒸黄连……皆是寒因热用,热因寒用,而无偏胜之害”。明代《普济方》中收录的葛花黄连丸、酒蒸黄连丸等,处方中黄连均为酒蒸品;在国家药品标准《新药转正标准》第 76 册中收录的天芪降糖胶囊,处方中黄连也为酒蒸品;在 2018 年版《天津市中药饮片炮制规范》黄连项下收录有酒蒸黄连,而在四川省食品药品监督管理局[2018 年第 60 号]公告中也颁布了酒蒸黄连饮片标准。有研究表明,给予黄连提取物后,T2DM 大鼠肠道微生物群的多样性发生了变化,表明黄连通过改善 T2DM 中肠道微生物群紊乱发挥部分抗糖尿病作用^[6]。既然在降低血糖等方面酒蒸黄连具有比黄连更佳的疗效^[7],故本研究拟给予正常大鼠和 T2DM 大鼠黄连生品或者酒蒸黄连,通过 16S rRNA 基因测序技术探讨其对肠道菌群的差异性调节,以及这些差异性调节与炮制前后的抗炎、抗氧化活性是否有关联性,为阐释黄连酒蒸“减毒增效”的炮制原理提供新见解。

1 材料

安稳型血糖仪(三诺生物传感股份有限公司),RE2000B 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),FA1204C 型电子天平(上海越平科学仪器有限公司),EMax Plus 型酶标仪(美国 Molecular Devices 公司),HR40-II A2 型生物安全柜(青岛海尔特种电器有限公司)。

血糖试纸(三诺生物传感股份有限公司,批号 821010);二甲双胍(默克雪兰诺有限公司,批号 AAW6112);链脲佐菌素(STZ, Sigma 公司,批号 WXBC3087V);实验动物普通饲料和高糖高脂饲料均购买于成都达硕实验动物有限公司;血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)试剂盒(杭州联科生物技术股份有限公司,批号分别为 A38281155, A30681252);核转录因子- κ B 亚基 p65(NF- κ B p65),丙二醛(MDA),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px),还原型谷胱甘肽(GSH),超氧化物歧化酶(SOD),过氧化氢酶(CAT)试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司,批号分别为 MZCH21L72M, V9GRI6ENAW, WPTB4MYG33, UN1KBWT5J9, RQQDW6FEVF, T6VRJP72VA)。

黄连、酒蒸黄连饮片均由雅安迅康药业有限公司提供(批号均为 180901,由同一批药材先制备成黄连饮片,再制备成酒蒸黄连饮片),经成都中医药

大学中药炮制教研室黄勤挽教授鉴定为毛茛科黄连 *Coptis chinensis* 的干燥根茎炮制加工品;通过 HPLC 测定(按干燥品计算),黄连饮片中 3 种生物碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀质量分数分别为 7.83%, 1.30%, 2.10%, 2.01%, 四者在酒蒸黄连饮片中质量分数依次为 7.40%, 1.46%, 1.89%, 1.92%。分别取适量黄连和酒蒸黄连饮片,第 1 次加 10 倍量水回流提取 1 h,过滤;第 2 次加 8 倍量水回流提取 1 h,过滤;合并 2 次滤液,减压浓缩成生药质量浓度为 0.2 g·mL⁻¹ 的黄连和酒蒸黄连水煎液,4 ℃ 保存备用。

SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 160 ~ 180 g,由成都达硕实验动物有限公司提供,合格证号 SCXK(川)2015-030。实验动物饲养于恒温,恒湿的动物实验饲养室内,自由饮食饮水,适应性饲养 1 周后开始实验。本文所涉及的动物实验经成都中医药大学实验动物福利伦理委员会批准,动物伦理审查备案编号 2018-09。

2 方法

2.1 T2DM 大鼠模型的制备 所有大鼠禁食不禁水 12 h 后测空腹血糖,选取血糖值 < 7.0 mmol·L⁻¹ 的大鼠进行后续实验。随机选取 30 只大鼠作为正常组给予普通饲料,其余的大鼠作为高脂饲料组给予高脂饲料,两组均自由饮食饮水。给予高脂饲料后的第 30 天,监测所有动物的饮食量和饮水量。第 31 天,所有动物禁食不禁水 12 h 后称质量,尾部取血检测空腹血糖。高脂饲料组按 30 mg·kg⁻¹ 腹腔内快速注射 STZ 溶液(10 g·L⁻¹)。注射 STZ 溶液后的 12 h 内,给予大鼠适量葡萄糖溶液。注射 STZ 溶液 3 d 后,高脂饲料组动物禁食不禁水 12 h,用血糖仪检测空腹血糖,选取血糖值 > 16.7 mmol·L⁻¹ 的大鼠。

2.2 分组与给药 把 T2DM 模型大鼠按血糖值在 16.7 ~ 18, 18 ~ 20, 20 ~ 25 mmol·L⁻¹ 分为 3 档,每档随机均分为模型组,生黄连模型组(模型 + 黄连组),酒蒸黄连模型组(模型 + 酒蒸黄连组),阳性药组(二甲双胍组),每组 10 只。模型 + 黄连组和模型 + 酒蒸黄连组按 0.8 g·kg⁻¹ 每天灌胃黄连或者酒蒸黄连水煎液,二甲双胍组按 0.25 g·kg⁻¹ 每天灌胃二甲双胍溶液,模型组每天灌胃等体积生理盐水。正常组的 30 大鼠随机分为正常组,生黄连正常组(正常 + 黄连组),酒蒸黄连正常组(正常 + 酒蒸黄连组),每组 10 只。正常 + 黄连组和正常 + 酒蒸黄连组于每天早上 9 点按 0.8 g·kg⁻¹ 灌胃生黄连或者

酒蒸黄连水煎液,正常组每天灌胃等体积生理盐水。所有大鼠均连续给药或生理盐水 30 d。

2.3 样品的准备 动物解剖前一天在无菌操作工作台上用灭菌镊子取大鼠应激排便的第 2 粒粪便,迅速转移至无菌冻存管,每组随机选出 6 个样本由成都罗宁生物科技有限公司进行肠道菌群多样性检测。解剖前用 30% 乌拉坦溶液麻醉大鼠后腹主动脉取血,静置,离心($3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min),取血清, $-80\ ^\circ\text{C}$ 冻存。取结肠,用 4% 多聚甲醛固定,从每组中随机选出 8 个样本进行病理切片检测。

2.4 空腹血糖及口服糖耐量的测定 于给药前和给药 1 周,2 周,3 周,4 周后,禁食不禁水用以尾尖采血-血糖仪法测定各组大鼠的空腹血糖(FBG)。按公式血糖变化率 = (给药后 FBG - 给药前 FBG) / 给药前 FBG $\times 100\%$ 计算。第 27 天末次给药后 10 min (禁食不禁水 12 h), 各组大鼠立即按 $3\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌服葡萄糖溶液,分别于 0, 0.5, 1, 2 h 以尾尖采血-血糖仪法测定各组大鼠的 FBG, 观察血糖随时间的变化并通过用梯形面积法计算血糖曲线下面积,以考察各组大鼠的糖耐量。以 BG0, BG0.5, BG1, BG2 分别代表灌服葡萄糖溶液 0, 0.5, 1, 2 h 后的血糖值。血糖曲线下面积(AUC)计算公式为 $\text{AUC} = 1/4(\text{BG}0 + \text{BG}0.5) + 1/4(\text{BG}0.5 + \text{BG}1) + 1/2(\text{BG}1 + \text{BG}2)$ 。

2.5 血清炎症因子水平测定 取 2.3 项下冻存的血清,按说明书对 TNF- α , NF- κ B p65 和 IL-6 进行检测。

2.6 血清抗氧化指标测定 取 2.3 项下冻存的血清,按说明书对 MDA, GSH-Px, GSH, SOD 和 CAT 进行检测。

2.7 组织形态学检测 取 4% 多聚甲醛固定的结肠组织,石蜡包埋后进行切片,脱水以及苏木精-伊红(HE)染色。

2.8 菌群 16S rRNA 测序分析 取大鼠粪便,抽提 DNA 后使用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA。按实验操作说明对纯化的基因组 DNA 进行聚合酶链式反应(PCR)扩增,引物使用 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')。对待测样本进行 PCR 产物检测、纯化和定量。使用 TruSeq DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 构建文库,构建好的文库经过定量和文库检测合格后,使用成都罗宁生物科技有限公司的 Hiseq 2500 平台 PE250 模式测序,测序得到的原始下机数据经过拼接,过滤得到

后续分析所需的高质量目标序列。

2.9 数据处理 基于 Usearch 软件 (<http://drive5.com/uparse/>),使用 UPARSE 算法^[8] 在 97% 的一致性水平上进行可操作分类单元(OTUs)分析,挑选每个 OTU 中出现频数最高的序列作为代表序列。使用 UCLUST 分类法^[9] 与 SILVA 数据库 (<http://www.arb-silva.de/>) 进行注释分析。采用 GraphPad Prism 9.0 进行抗炎和抗氧化与菌种的关系分析。采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析,各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,满足方差齐性用最小显著性差异(LSD)或 Dunnett 法分析,不满足方差齐性用 Dunnett's T3 或 Tamhane's T2 法进行分析,分析结果均以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 FBG 及口服糖耐量的影响 由表 1 可知,经过高脂饮食联合小剂量 STZ 造模后,与正常组比较,模型组大鼠的 FBG 显著上升($P < 0.01$)。模型 + 黄连组、模型 + 酒蒸黄连组、二甲双胍组大鼠的 FBG 于给药开始后均有下降;其中,给予酒蒸黄连、二甲双胍分别治疗 2 周后,与模型组比较有明显差异($P < 0.05$);给予黄连、酒蒸黄连、二甲双胍后的第 3, 4 周, T2DM 大鼠 FBG 显著下降($P < 0.01$);同一时间点,模型 + 酒蒸黄连组下降趋势较模型 + 黄连组明显,但无统计学意义。由表 2 可知,在灌服葡萄糖溶液后,与正常组比较,模型组大鼠各时间点血糖均显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,给药组大鼠各时间点的血糖均降低。在 1 h 时,模型 + 酒蒸黄连组大鼠的血糖显著低于模型组($P < 0.05$); 2 h 时,模型 + 酒蒸黄连组和模型 + 黄连组大鼠的血糖明显低于模型组($P < 0.01$)。模型 + 酒蒸黄连组大鼠在各时间点的血糖均低于模型 + 黄连组,但无统计学意义。

3.2 对血清炎症因子的影响 由表 3 可知,与正常组比较,正常大鼠给予黄连及酒蒸黄连后,血清 IL-6 和 TNF- α 明显上升($P < 0.05$, $P < 0.01$);模型组大鼠血清中 IL-6 和 NF- κ B 明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。模型 + 酒蒸黄连组比模型 + 黄连组的作用效果更明显。与模型组比较,给予黄连、酒蒸黄连和二甲双胍均能显著降低 IL-6 的水平($P < 0.01$),也均有降低 TNF- α 和 NF- κ B 表达的趋势,但只有部分具有统计学意义。

3.3 对血清抗氧化指标的影响 由表 4 可知,与正常组比较,模型组大鼠血清中的 GSH-Px, SOD, CAT 和 GSH 活力明显降低($P < 0.01$),MDA 含量显著

表 1 黄连酒蒸前后对 T2DM 大鼠空腹血糖变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	给予 STZ 后	给药 1 周	给药 2 周	给药 3 周	给药 4 周
正常	-	4.82 ± 0.27	4.53 ± 0.56	4.72 ± 0.29	4.89 ± 0.26	4.94 ± 0.26
模型	-	21.78 ± 3.39 ¹⁾	20.04 ± 4.10 ¹⁾	20.74 ± 1.92 ¹⁾	20.79 ± 1.46 ¹⁾	21.08 ± 1.92 ¹⁾
模型 + 黄连	0.8	20.41 ± 3.35	19.81 ± 3.98	17.66 ± 3.54	15.99 ± 2.78 ³⁾	14.18 ± 1.94 ³⁾
模型 + 酒蒸黄连	0.8	20.76 ± 3.10	19.36 ± 2.30	17.10 ± 2.54 ²⁾	15.18 ± 1.20 ³⁾	12.58 ± 0.85 ³⁾
二甲双胍	0.25	21.10 ± 3.10	18.17 ± 2.43	17.43 ± 2.19 ²⁾	14.33 ± 0.98 ³⁾	10.52 ± 1.15 ³⁾

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

表 2 黄连酒蒸前后对 T2DM 大鼠糖耐量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of raw and steamed products of Coptidis Rhizoma on oral glucose tolerance of T2DM rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	血糖/ $mmol \cdot L^{-1}$				AUC
		0	0.5 h	1 h	2 h	
正常	-	4.36 ± 0.83	7.65 ± 0.73	11.34 ± 1.30	6.71 ± 0.67	16.77 ± 0.93
模型	-	20.92 ± 2.31 ¹⁾	22.36 ± 1.82 ¹⁾	25.42 ± 1.23 ¹⁾	20.48 ± 1.64 ¹⁾	45.71 ± 1.34 ¹⁾
模型 + 黄连	0.8	12.22 ± 1.81 ²⁾	19.25 ± 2.70	22.09 ± 3.72	15.93 ± 2.94 ²⁾	37.21 ± 4.92 ²⁾
模型 + 酒蒸黄连	0.8	12.27 ± 1.62 ²⁾	18.25 ± 4.33	21.75 ± 1.62 ²⁾	14.52 ± 2.88 ²⁾	35.76 ± 3.72 ²⁾
二甲双胍	0.25	10.73 ± 2.15 ²⁾	15.16 ± 2.85 ²⁾	20.34 ± 2.26 ²⁾	13.75 ± 2.22 ²⁾	32.39 ± 3.31 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

表 3 黄连酒蒸前后对正常或 T2DM 大鼠炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of raw and steamed products of Coptidis Rhizoma on inflammatory factor levels of normal rats or T2DM rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	IL-6	NF- κ B	TNF- α
正常	-	21.47 ± 12.16	529.91 ± 155.93	127.20 ± 64.41
模型	-	45.31 ± 11.29 ²⁾	1 071.12 ± 621.85 ¹⁾	174.88 ± 35.87
模型 + 黄连	0.8	31.87 ± 8.14 ⁴⁾	768.10 ± 464.34	157.60 ± 47.02
模型 + 酒蒸黄连	0.8	25.37 ± 10.46 ⁴⁾	400.42 ± 242.04 ³⁾	141.20 ± 65.61
二甲双胍	0.25	23.33 ± 9.75 ⁴⁾	696.92 ± 278.47 ³⁾	114.68 ± 19.96 ³⁾
正常 + 黄连	0.8	43.62 ± 6.60 ²⁾	1 185.72 ± 569.78 ¹⁾	195.60 ± 77.15
正常 + 酒蒸黄连	0.8	26.61 ± 8.52 ^{1,5)}	1 046.26 ± 673.19 ¹⁾	176.24 ± 36.01

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⁾ $P < 0.01$;与正常 + 黄连组比较⁵⁾ $P < 0.05$ 。

升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,各模型给药组的 GSH-Px, SOD, CAT 和 GSH 活力均明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), MDA 含量显著降低 ($P < 0.01$);同时,正常大鼠给予黄连和酒蒸黄连后,与正常组比较,给药组 GSH-Px, GSH, CAT 和 SOD 活力降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型 + 黄连组比较,模型 + 酒蒸黄连组的 GSH, SOD 和 MDA 水平具有显著性差异 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与正常 + 黄连组比较,正常 + 酒蒸黄连组的 MDA 含量明显降低 ($P < 0.05$)。

3.4 对结肠病理形态学的影响 根据各组大鼠的 HE 染色结果 ($n = 8$) 可知,正常组大鼠结肠黏膜结构完整,无炎症细胞浸润,无大肠腺萎缩等病理变化;模型组大鼠大肠腺萎缩,炎症细胞浸润明显;模型 + 酒蒸黄连组与正常组基本相同,模型 + 黄连组存在一定的固有层炎细胞浸润;正常 + 黄连组大鼠结肠出现固有层水肿、炎细胞浸润的病理改变,正常 + 酒蒸黄连组大鼠出现一定的肌层肌纤维脂肪变性。见图 1。

表 4 黄连酒蒸前后对正常或 T2DM 大鼠抗氧化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of raw and steamed products of Coptidis Rhizoma on antioxidant index levels of normal rats or T2DM rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	GSH-Px/U	GSH/μmol·L ⁻¹	CAT/U·mL ⁻¹	SOD/U·mL ⁻¹	MDA/μmol·L ⁻¹
正常	-	720.80 ± 23.89	737.69 ± 13.33	0.610 ± 0.011	97.46 ± 5.74	1.91 ± 0.48
模型	-	300.80 ± 65.24 ²⁾	354.90 ± 18.87 ²⁾	0.312 ± 0.011 ²⁾	30.07 ± 11.28 ²⁾	4.92 ± 0.67 ²⁾
模型 + 黄连	0.8	460.00 ± 19.28 ³⁾	455.38 ± 30.60 ³⁾	0.523 ± 0.014 ³⁾	63.61 ± 15.52 ³⁾	3.80 ± 0.34 ³⁾
模型 + 酒蒸黄连	0.8	477.66 ± 20.02 ³⁾	511.79 ± 14.57 ^{3,6)}	0.532 ± 0.014 ³⁾	76.29 ± 26.76 ^{3,5)}	3.51 ± 0.37 ^{3,5)}
二甲双胍	0.25	473.20 ± 1.09 ³⁾	549.23 ± 22.59 ³⁾	0.543 ± 0.011 ³⁾	75.86 ± 19.30 ³⁾	2.98 ± 0.34 ³⁾
正常 + 黄连	0.8	378.66 ± 33.09 ²⁾	376.92 ± 17.32 ²⁾	0.413 ± 0.004 ²⁾	44.60 ± 5.63 ²⁾	2.49 ± 0.54 ¹⁾
正常 + 酒蒸黄连	0.8	410.00 ± 48.93 ²⁾	391.53 ± 27.89 ²⁾	0.434 ± 0.008 ²⁾	49.87 ± 5.05 ¹⁾	2.04 ± 0.40 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.01$;与正常 + 黄连组比较⁴⁾ $P < 0.05$;与模型 + 黄连组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ 。

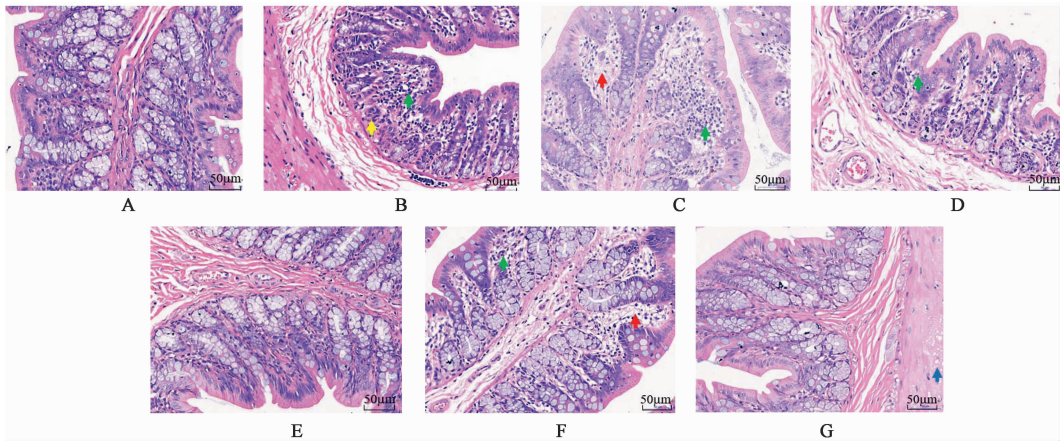


图 1 黄连酒蒸前后对正常或 T2DM 大鼠结肠组织病理学的影响 (HE, ×400)

Fig. 1 Effect of raw and steamed products of Coptidis Rhizoma on colonic histopathology of normal rats or T2DM rats (HE, ×400)

3.5 肠道菌群测序

3.5.1 大鼠肠道菌群多样性分析 通过分析样本稀释曲线, Rank-Abundance 曲线和 alpha 多样性指数对大鼠肠道菌群的丰富度、均匀度和多样性进行研究, 见表 5 和图 2, 3。

由表 5 和图 2, 3 可知与正常组比较, 正常 + 黄连组香农指数 (Shannon 指数)、菌种丰富度指数

(Chao1 指数) 和系统发育多样性指数 (PD 指数) 均显著降低 (均 $P < 0.01$); 正常 + 酒蒸黄连组各指数则均无明显变化; 模型组辛普森多样性指数 (Simpson 指数) 显著降低 ($P < 0.01$), Chao1 指数和 PD 指数显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各模型给药组群落丰富度指数 (Chao1 指数), 群落多样性指数 (Shannon 指数和 Simpson 指数) 和系统发育

表 5 黄连酒蒸前后对大鼠肠道菌群 alpha 多样性指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Effect of raw and steamed products of Coptidis Rhizoma on alpha diversity indexes of intestinal flora in rats from each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Chao1	Shannon	Simpson	PD
正常	-	1 155.25 ± 26.52	5.33 ± 0.02	0.99 ± 0.000 5	47.85 ± 0.32
模型	-	2 037.73 ± 36.12 ¹⁾	5.53 ± 0.11	0.96 ± 0.006 7 ¹⁾	91.31 ± 1.54 ¹⁾
模型 + 黄连	0.8	971.11 ± 45.31 ³⁾	4.90 ± 0.03 ²⁾	0.98 ± 0.000 6 ²⁾	44.99 ± 0.60 ³⁾
模型 + 酒蒸黄连	0.8	1 234.31 ± 35.34 ^{3,7)}	5.14 ± 0.02 ^{2,6)}	0.98 ± 0.000 3 ²⁾	55.23 ± 1.44 ^{3,7)}
二甲双胍	0.25	730.00 ± 30.13 ³⁾	4.15 ± 0.01 ³⁾	0.95 ± 0.001 1 ³⁾	35.08 ± 0.60 ³⁾
正常 + 黄连	0.8	883.09 ± 18.52 ¹⁾	4.83 ± 0.01 ¹⁾	0.98 ± 0.000 2 ¹⁾	40.65 ± 0.42
正常 + 酒蒸黄连	0.8	1 080.04 ± 47.56 ⁵⁾	5.29 ± 0.09 ⁴⁾	0.99 ± 0.001 3 ⁴⁾	48.60 ± 1.45 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$;与正常 + 黄连组比较⁴⁾ $P < 0.05$, ⁵⁾ $P < 0.01$;与模型 + 黄连组比较⁶⁾ $P < 0.05$, ⁷⁾ $P < 0.01$ 。

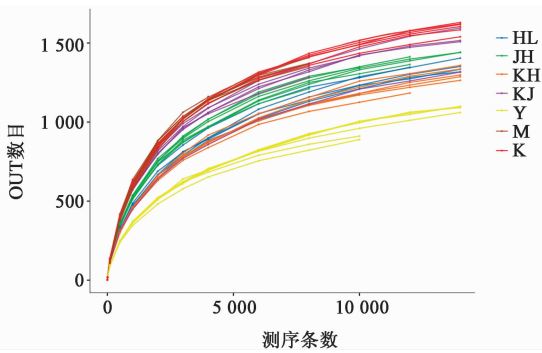


图 2 各组大鼠肠道菌群的样本稀释曲线

Fig. 2 Rarefaction curve of intestinal flora in rats from each group

多样性指数 (PD 指数) 均显著改变 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。说明黄连可使正常大鼠肠道菌群的物种总数、群落多样性和微生物多样性显著降低,而酒蒸黄连则无明显改变。黄连酒蒸前后均能促使糖尿病大鼠肠道菌群多样性的恢复,且黄连酒蒸前后作用存在一定差异。

主坐标分析 (PCoA) 见图 4。结果发现 PCo1 和 PCo2 对总体方差解释的百分比分别为 54.5% 和 22.4%。正常 + 黄连组样本点与正常组的距离比正常 + 酒蒸黄连组样本点更远;模型组和正常组完全分开,模型给药组样本点与正常组样本点的距离比

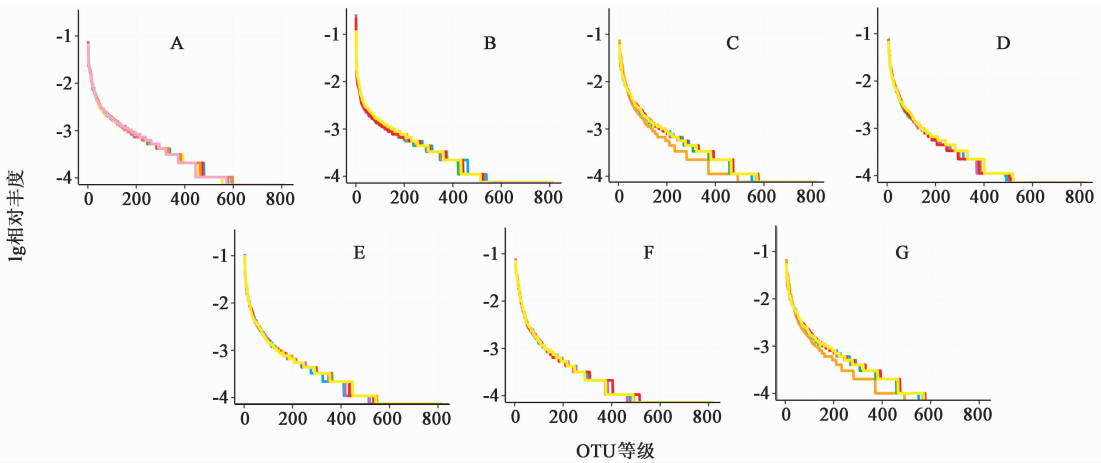


图 3 各组大鼠肠道菌群的 Rank-Abundance 曲线

Fig. 3 Rank-Abundance curves of intestinal flora in rats from each group

模型组更近,表明黄连对正常大鼠的影响比对酒蒸黄连更大;糖尿病状态下大鼠的肠道菌群发生了明显改变,但黄连酒蒸前后均能逆转这种改变。

门 (Proteobacteria) 为优势类群。由表 6 可知,与正常组比较,模型组大鼠肠道菌群发生显著变化,黄连酒蒸前后对正常大鼠的肠道菌群有较大影响,且黄连可以显著降低 Proteobacteria,但酒蒸黄连则无此作用。与模型组比较,各给药组均能显著调节 T2DM 大鼠的肠道菌群;黄连对 Kiritimatiellaeota, 蓝细菌门 (Cyanobacteria) 和 疣微菌门 (Verrucomicrobia) 的调节作用强于酒蒸黄连;酒蒸黄连可以显著降低绿弯菌门 (Chloroflexi), 但黄连则无此作用。

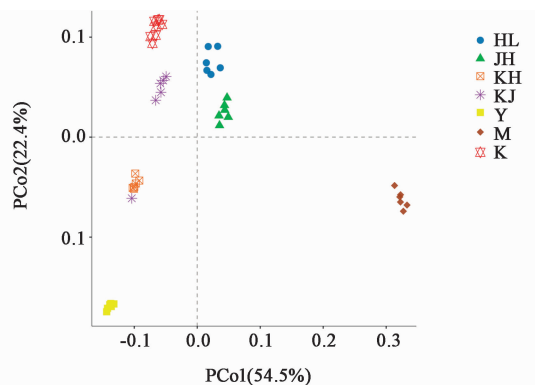


图 4 各组大鼠肠道菌群的 PCoA 得分分布

Fig. 4 PCoA score distribution of intestinal flora in rats from each group

3.5.2 大鼠肠道菌群分类学组成分析 门水平下各组大鼠肠道菌群的组成情况见图 5,其中拟杆菌门 (Bacteroidetes), 厚壁菌门 (Firmicutes) 和变形菌

属水平下各组大鼠肠道菌群的组成情况见图 6,其中拟杆菌属 (*Bacteroides*), 志贺菌属 (*Escherichia Shigella*), *Prevotellaceae UCG-003*, 毛螺旋菌属 *Lachnospiraceae NK4A136 group*, 普雷沃菌属 (*Prevotella*), 异普雷沃菌属 (*Alloprevotella*), [*Eubacterium*] *Coprostanoligenes group*, *Catenibacterium*, 瘤胃球菌属 *Ruminococcaceae UCG-005* 和乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 为高丰度物种。与正常组比较,模型组有显著差异的有 7 个,1 个上调,

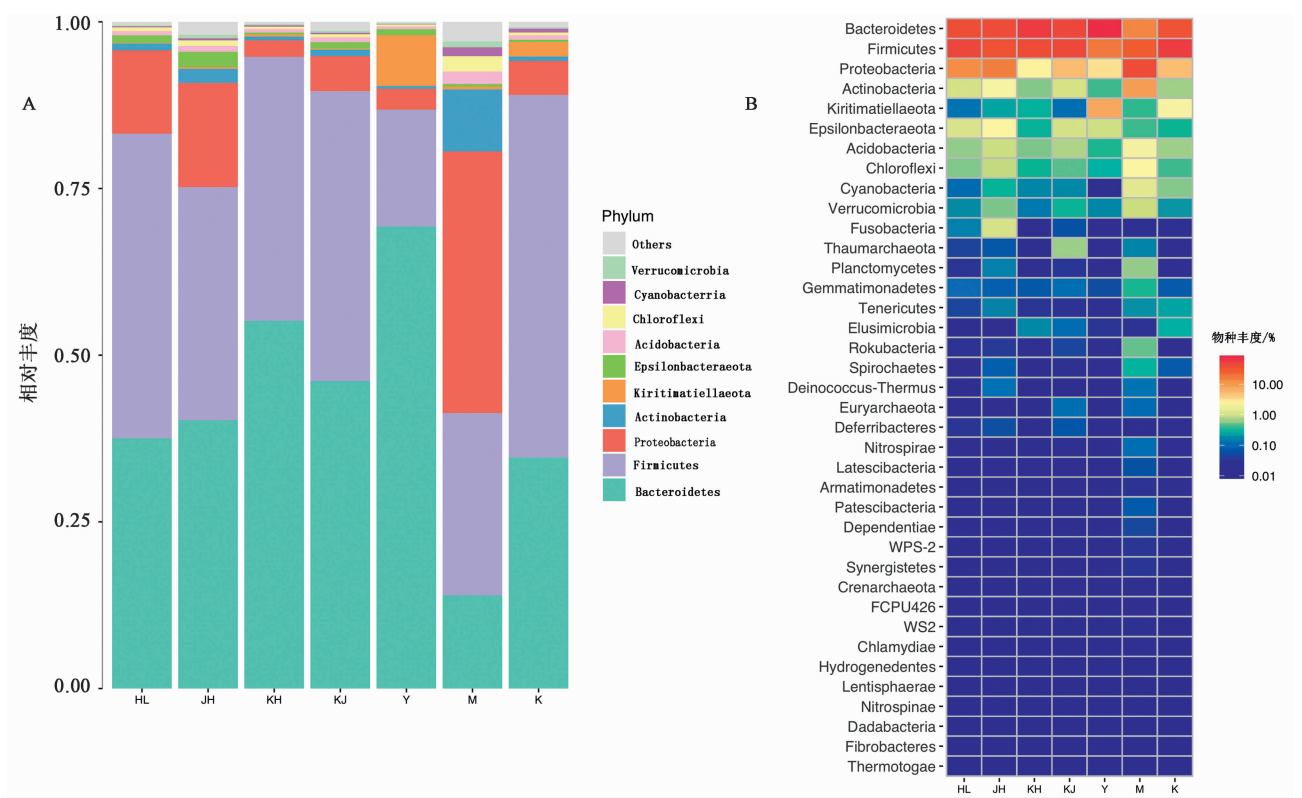


图 5 各组大鼠肠道菌群门水平的群落分类相对丰度 (A) 和高丰度物种的热分析 (B) ($n = 6$)

Fig. 5 Relative abundance of community classification (A) and heatmap of species with high abundance (B) of intestinal flora in rats from each group at phylum level ($n = 6$)

表 6 各组大鼠肠道菌群门分类水平高丰度物种的相对丰度比较 ($n = 6$)

Table 6 Comparison of relative abundance values of species with high abundance at phylum level on intestinal flora in rats from each group ($n = 6$)

门分类	与正常组比较			与模型组比较		
	模型	正常 + 黄连	正常 + 酒蒸黄连	二甲双胍	模型 + 黄连	模型 + 酒蒸黄连
Bacteroidetes	↓ ²⁾	↑ ²⁾	↑ ¹⁾	↑ ³⁾	↑ ⁴⁾	↑ ^{4,6)}
Firmicutes	↓ ²⁾	↓ ²⁾	↓ ²⁾	↓ ⁴⁾	↑ ⁴⁾	↑ ^{4,7)}
Proteobacteria	↑ ²⁾	↓ ¹⁾	-	↓ ⁴⁾	↓ ⁴⁾	↓ ^{4,7)}
放线菌门 (Actinobacteria)	↑ ²⁾	-	-	↓ ⁴⁾	↓ ⁴⁾	↓ ⁴⁾
Kiritimatiellaeota	↓ ²⁾	↓ ²⁾	↓ ^{2,5)}	↑ ⁴⁾	↓ ⁴⁾	↓ ³⁾
Epsilonbacteraeota	-	-	-	↑ ⁴⁾	↑ ⁴⁾	↑ ^{4,7)}
酸杆菌门 (Acidobacteria)	↑ ²⁾	-	-	↓ ⁴⁾	↓ ⁴⁾	↓ ⁴⁾
Chloroflexi	↑ ²⁾	-	-	-	-	↓ ^{4,6)}
Cyanobacteria	↑ ¹⁾	↓ ²⁾	↓ ²⁾	↓ ⁴⁾	↓ ⁴⁾	↓ ^{3,7)}
Verrucomicrobia	↑ ²⁾	-	-	↓ ⁴⁾	↓ ⁴⁾	↓ ^{3,6)}

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⁾ $P < 0.01$;与正常 + 黄连组比较⁵⁾ $P < 0.05$;与模型 + 黄连组比较⁶⁾ $P < 0.05$, ⁷⁾ $P < 0.01$ 。↑. 上升; ↓. 下降, - . 无统计学意义 (表 7 同)。

6 个下调;正常 + 黄连组有显著差异的有 8 个,5 个上调,3 个下调;正常 + 酒蒸黄连组具有显著差异的有 5 个,2 个上调,3 个下调;黄连可以显著上调 *Bacteroides*, *Catenibacterium* 和 *Lactobacillus*, 但酒蒸黄连无此作用。与模型组比较,模型 + 黄连组具有

显著差异的有 8 个,上调 3 个,下调 5 个;模型 + 酒蒸黄连组具有显著差异的有 8 个,上调 4 个,下调 4 个;黄连可显著下调普雷沃菌属 9 (*Prevotella* 9) 的表达,但酒蒸黄连无此作用;酒蒸黄连可以显著上调 *Prevotellaceae* UCG-003, 但黄连无此作用,见表 7。

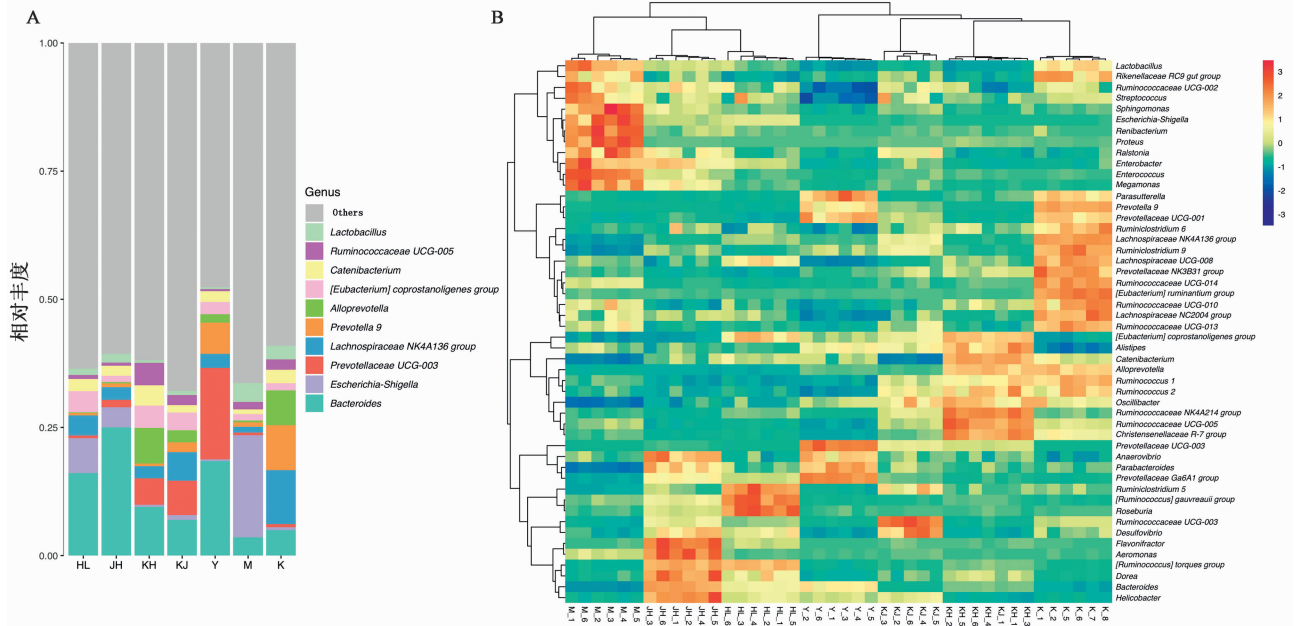


图 6 各组大鼠肠道菌群属水平的群落分类相对丰度 (A) 和高丰度物种的热分析 (B) ($n = 6$)

Fig. 6 Relative abundance of community classification (A) and heatmap of species with high abundance (B) of intestinal flora in rats from each group at genus level ($n = 6$)

表 7 各组大鼠肠道菌群属分类水平高丰度物种的相对丰度比较 ($n = 6$)

Table 7 Comparison of relative abundance values of species with high abundance on intestinal flora in rats from each group at genus level ($n = 6$)

属分类	与正常组比较			与模型组比较		
	模型	正常 + 黄连	正常 + 酒蒸黄连	二甲双胍	模型 + 黄连	模型 + 酒蒸黄连
<i>Bacteroides</i>	↓ ²⁾	↑ ²⁾	—	↑ ⁴⁾	↑ ⁴⁾	↑ ^{4,8)}
<i>Escherichia Shigella</i>	↑ ²⁾	—	— ⁶⁾	↓ ⁴⁾	↓ ⁴⁾	↓ ^{4,8)}
Prevotellaceae UCG-003	—	↑ ²⁾	↑ ²⁾	↑ ⁴⁾	—	↑ ^{4,8)}
Lachnospiraceae NK4A136 group	↓ ²⁾	↓ ²⁾	↓ ²⁾	↑ ⁴⁾	↑ ⁴⁾	↑ ^{4,8)}
Prevotella 9	↓ ²⁾	↓ ²⁾	↓ ^{2,5)}	↑ ⁴⁾	↓ ³⁾	— ⁸⁾
Alloprevotella	↓ ²⁾	—	—	↑ ⁴⁾	↓ ³⁾	↓ ⁴⁾
[<i>Eubacterium</i>] Coprostanoligenes group	—	↑ ²⁾	↑ ^{2,6)}	↑ ⁴⁾	—	— ⁸⁾
Catenibacterium	↓ ²⁾	↑ ²⁾	— ⁵⁾	↑ ⁴⁾	↑ ⁴⁾	↑ ⁴⁾
<i>Lactobacillus</i>	↓ ¹⁾	↑ ²⁾	—	↓ ⁴⁾	↓ ⁴⁾	↓ ⁴⁾
Ruminococcaceae UCG-005	—	↓ ²⁾	↓ ^{2,6)}	↓ ⁴⁾	↓ ⁴⁾	↓ ^{4,7)}

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⁾ $P < 0.01$;与正常 + 黄连组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$;与模型 + 黄连组比较⁷⁾ $P < 0.05$, ⁸⁾ $P < 0.01$ 。

分析 10 个高丰度菌门与炎症和氧化-抗氧化系统相关因子的相关性,见图 7。结果发现在抗炎方面, $TNF-\alpha$ 的表达与肠道菌群具有较低的相关性。在抗氧化方面, SOD 的表达与 Firmicutes 具有较高的相关性。

4 讨论

人体肠道微生物是人体的“第二基因组”^[10-12]。

肠道微生物群在物种丰富度、多样性、组成和功能方面的变化可能伴随着营养物质利用和合成等方面的改变,这些改变将对宿主生理反应产生深远的影响^[13]。许多研究表明, T2DM 和肠道微生物紊乱密切相关^[14]。黄连及其主要生物碱成分小檗碱可通过改善 T2DM 大鼠肠道菌群紊乱而对其症状有改善作用^[6,15]。黄连酒蒸可以达到“减毒增效”的炮制

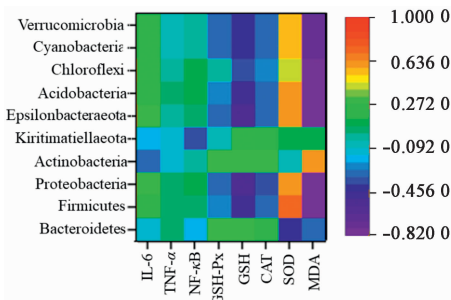


图 7 各组大鼠肠道菌群高丰度菌门与炎症和氧化-抗氧化系统相关因子的相关性分析

Fig. 7 Relationship between inflammation, oxidation-antioxidant system and microbial community on intestinal flora in rats from each group at phylum level

目的,即降低苦寒之性,提高降血糖、改善糖脂代谢紊乱和胰岛素抵抗等方面的疗效^[16]。但这些作用是否与肠道菌群有关尚未见报道。

研究表明肠道菌群和全身性炎症、抗氧化功能失调密切相关。T2DM 肠道通透性增加,肠道中含有脂多糖的微生物群的比例增加,进而通过内毒素血症引发全身性轻度炎症反应^[17]。在高脂肪饮食和 STZ 诱导的 T2DM 大鼠的胃肠道中,小檗碱通过抑制肠组织中 Toll 样受体 4(TLR4)/髓样分化因子 88(MyD88)/NF-κB 信号通路的表达^[18]、抑制紧密连接蛋白 1(ZO1)的减少^[19]等方式缓解肠免疫系统炎症变化,减弱肠屏障损伤和恢复肠道通透性。肠道微生物群失调会导致氧化应激增加^[13]。黄连多糖和小檗碱均可增加 SOD 和 CAT 的活性、降低 MDA 的含量,从而产生抗糖尿病活性^[20-23]。本研究发现,黄连酒蒸前后均能减轻 T2DM 大鼠的炎症反应,提高机体的抗氧化能力以及修复 T2DM 导致的结肠损伤,这些改变可能与肠道菌群相关,且酒蒸黄连作用强于黄连生品。长期给予黄连生品或者酒蒸黄连均能导致正常大鼠结肠损伤以及机体的炎症反应和氧化失衡,但黄连生品对正常大鼠结肠、抗炎抗氧化系统的损伤作用强于酒蒸黄连,这也证明了黄连酒蒸后毒性降低。通过对抗炎、抗氧化活性与菌种关系进行分析后发现,黄连酒蒸前后的抗氧化能力可能和肠道菌群,特别是 Firmicutes 有一定的相关性,但这还有待进一步的试验研究确认。

正常或“健康”的肠道微生物群主要包括 Firmicutes(约 50% ~ 75%)和 Bacteroidetes(约 10% ~ 50%)^[10]。糖尿病大鼠的 Firmicutes 显著降低,这与 Larsen 等^[24]的研究结果一致,而黄连酒蒸前后均能逆转这种改变。本文研究结果表明 T2DM

大鼠肠道菌群多样性增加可能与肠道菌群紊乱、致病菌(如 *Escherichia shigella*)增加等有关。肠道菌群紊乱抑制短链脂肪酸(SCFA)的产生和转化,成为诱发糖尿病的重要因素^[25]。肠道中最主要的 SCFA 有乙酸、丙酸、丁酸^[26]。产丙酸菌主要属于 Bacteroidetes,包括 *Bacteroides* 和双歧杆菌(*Bifidobacterium*)等,黄连酒蒸前后均能显著增加 *Bacteroides* 的表达。毛螺旋菌是机体的有益菌,能将复杂的多糖降解为 SCFA^[27],黄连酒蒸前后均能提高毛螺旋菌的表达。提示黄连酒蒸前后均能通过升高有益菌和降低条件致病菌的表达而对 T2DM 起到治疗作用。*Prevotella* 是人类口腔和大肠中发现的重要微生物群之一,肠道共生 *Prevotella* 有助于多糖分解^[28],黄连生品可以显著抑制 *Prevotella* 9 的表达,但酒蒸黄连无此作用。黄连生品对 Kiritimatiellaota 和 Cyanobacteria 等的抑制作用强于酒蒸黄连,但酒蒸黄连对 Chloroflexi 有明显的抑制作用而黄连生品却没有。提示黄连酒蒸前后的作用差异可能归因于对某些特定菌群的调节。有研究表明,在降低血糖等方面酒蒸黄连具有比黄连更佳的疗效^[7],但本研究发现黄连酒蒸后降低 T2DM 大鼠的空腹血糖以及提高糖耐量的作用有增加趋势,但无显著差异。黄连酒蒸前后的疗效主要体现在对 T2DM 大鼠抗氧化作用的增加以及肠道菌群的差异性调节。另外,本研究发现黄连或者酒蒸黄连对某些菌群(如 Firmicutes)具有双向调节作用,例如在正常生理状态下,两者均能降低 Firmicutes 的相对丰度,但在 T2DM 状态下,两者均能升高其相对丰度。

综上所述,黄连酒蒸前后均能通过调节 T2DM 大鼠的肠道菌群紊乱而发挥治疗作用,且通过比较两者在 T2DM 大鼠模型上的降血糖、抗炎、抗氧化和抗肠道菌群紊乱作用差异,证明了黄连酒蒸能到达“增效”的炮制目的。通过正常大鼠给药,发现黄连酒蒸后具有更小的胃肠毒性以及更低的炎症反应,这可能与黄连酒蒸后“苦寒”毒性降低有关,证明了黄连酒蒸能到达“减毒”的炮制目的。另外,在正常大鼠上观察到的黄连的“苦寒”毒性在 T2DM 大鼠模型上不再适用,提示黄连的毒性研究应建立在具体的疾病模型基础之上。

[参考文献]

[1] ZHENG Y, Ley S H, HU F B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its

- complications [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 14 (2): 88-98.
- [2] HU C, JIA W. Diabetes in China: epidemiology and genetic risk factors and their clinical utility in personalized medication [J]. *Diabetes*, 2018, 67 (1): 3-11.
- [3] Jhong C H, Riyaphan J, LIN S H, et al. Screening α -glucosidase and α -amylase inhibitors from natural compounds by molecular docking in silico [J]. *Biofactors*, 2015, 41(4): 242-251.
- [4] Thomas C C, Philipson L H. Update on diabetes classification [J]. *Med Clin North Am*, 2015, 99 (1): 1-16.
- [5] 戴丛书, 于卓, 李光耀, 等. 清肺泻肝汤对 2 型糖尿病患者炎症指标和肠道菌群的调节作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(18): 83-88.
- [6] 顾宁宁, 张兴德, 郁红礼, 等. 基于 16S rRNA 基因测序的黄连对 2 型糖尿病大鼠肠道微生物多样性影响研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(19): 103-109.
- [7] 李佳川. 基于本草知识的酒蒸黄连“止消渴”系统研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2011.
- [8] Edgar R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 996-998.
- [9] Edgar R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26 (19): 2460-2461.
- [10] Gill S R, Pop M, Deboy R T, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome [J]. *Science*, 2006, 312(5778): 1355-1359.
- [11] Bäckhed F, Ley R E, Sonnenburg J L, et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine [J]. *Science*, 2005, 307(5717): 1915-1920.
- [12] Cani P D, Delzenne N M. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2007, 10(6): 729-934.
- [13] Le Chatelier E, Nielsen T, QIN J, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers [J]. *Nature*, 2013, 500(7464): 541-546.
- [14] 吴莉娟, 孙文, 吴丽丽, 等. 糖耐康对 T2DM 大鼠 ZDF 肠道菌群结构的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(8): 98-104.
- [15] MA H, HE K, ZHU J, et al. The anti-hyperglycemia effects of Rhizoma Coptidis alkaloids: a systematic review of modern pharmacological studies of the traditional herbal medicine [J]. *Fitoterapia*, 2019, 134: 210-220.
- [16] 李佳川, 孟宪丽, 崔蓉, 等. 不同黄连炮制品“止消渴”药效学比较研究 [J]. *中成药*, 2010, 32 (11): 1922-1925.
- [17] Cani P D, Amar J, Iglesias M A, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance [J]. *Diabetes*, 2007, 56(7): 1761-1772.
- [18] GONG J, HU M, HUANG Z, et al. Berberine attenuates intestinal mucosal barrier dysfunction in type 2 diabetic rats [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 42.
- [19] SHAN C Y, YANG J H, KONG Y, et al. Alteration of the intestinal barrier and GLP2 secretion in berberine-treated type 2 diabetic rats [J]. *J Endocrinol*, 2013, 218 (3): 255-262.
- [20] JIANG S, WANG Y, REN D, et al. Antidiabetic mechanism of *Coptis chinensis* polysaccharide through its antioxidant property involving the JNK pathway [J]. *Pharm Biol*, 2015, 53(7): 1022-1029.
- [21] JIANG S, DU P, AN L, et al. Anti-diabetic effect of *Coptis chinensis* polysaccharide in high-fat diet with STZ-induced diabetic mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 55: 118-122.
- [22] Chatuphonprasert W, Lao-Ong T, Jarukamjorn K. Improvement of superoxide dismutase and catalase in streptozotocin-nicotinamide-induced type 2-diabetes in mice by berberine and glibenclamide [J]. *Pharm Biol*, 2014, 52(4): 419-427.
- [23] CHANG W, CHEN L, Hatch G M. Berberine as a therapy for type 2 diabetes and its complications: from mechanism of action to clinical studies [J]. *Biochem Cell Biol*, 2015, 93(5): 479-486.
- [24] Larsen 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.
- [25] 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.
- [26] Sivaprakasam S, Prasad P D, Singh N. Benefits of short-chain fatty acids and their receptors in inflammation and carcinogenesis [J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 164: 144-151.
- [27] Meijer K, de Vos P, Priebe M G. Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: what relevance for health? [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2010, 13(6): 715-721.
- [28] Precup G, Vodnar D C. Gut *Prevotella* as a possible biomarker of diet and its eubiotic versus dysbiotic roles: a comprehensive literature review [J]. *Br J Nutr*, 2019, 122(2): 131-140.

[责任编辑 刘德文]