

本文引用: 杨诗尧, 李 鸿, 黎 柳, 谭丹妮, 刘 秀, 向 琴, 黄秋晴, 邹俊驹, 喻 嵘. 当归芍药散对糖尿病肾病 db/db 小鼠肠道菌群的作用[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(12): 2172-2182.

当归芍药散对糖尿病肾病 db/db 小鼠肠道菌群的作用

杨诗尧¹, 李 鸿¹, 黎 柳¹, 谭丹妮¹, 刘 秀^{1,2}, 向 琴³, 黄秋晴¹, 邹俊驹¹, 喻 嵘^{1,2*}

1. 湖南中医药大学中医学院, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学中医方证研究转化医学湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208; 3. 湖南中医药大学科技处, 湖南 长沙 410208

[摘要] **目的** 研究当归芍药散(Danggui Shaoyao San, DSS)对糖尿病肾病小鼠肠道菌群的作用。**方法** 选取30只8周龄雄性db/db小鼠,6只8周龄雄性db/m小鼠。检测空腹血糖以及尿白蛋白/肌酐比值(urinary albumin to creatinine ratio, UACR),将符合要求的db/db小鼠随机分成5组:模型(MOD)组(0.1 mL/10 g 蒸馏水)、达格列净(DAPA)组(1.3 mg/kg 达格列净片)及DSS低剂量(DSS-L)组(8.39 g/kg)、中剂量(DSS-M)组(16.77 g/kg)、高剂量(DSS-H)组(33.54 g/kg),每组6只;6只db/m小鼠为空白对照(CON)组(0.1 mL/10 g 蒸馏水)。测定小鼠空腹血糖、胰岛素耐量;ELISA法测定血尿素氮和血肌酐;全自动生化分析仪检测UACR;对小鼠的肾脏组织和小肠组织进行HE染色;取小鼠结肠粪便进行16S rRNA测序。**结果** 与CON组比较,MOD组糖耐量下降,空腹血糖、血尿素氮、血肌酐、UACR升高($P<0.01$);与MOD组比较,DSS组的糖耐量升高($P<0.01$),空腹血糖、血尿素氮、血肌酐、UACR降低($P<0.01$),肾脏和小肠的病理损伤程度降低。肠道菌群多样性研究结果显示:相比CON组,MOD组肠道菌群多样性降低;相比MOD组,DSS-M组与CON组的菌群差异性较小。在菌群的物种组成方面,DSS-M组小鼠嗜黏蛋白阿克曼氏菌(*Akkermansia muciniphila*)的相对丰度明显增加($P<0.01$)。**结论** DSS能显著增加糖尿病肾病db/db小鼠肠道中的嗜黏蛋白阿克曼氏菌的丰度,可能是其改善糖尿病肾病的机制之一。

[关键词] 糖尿病肾病;当归芍药散;肠道菌群;活水利水法;糖尿病;16S rRNA;中医药

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.12.005

Effects of Danggui Shaoyao San on the intestinal flora of db/db mice with diabetic nephropathy

YANG Shiyao¹, LI Hong¹, LI Liu¹, TAN Danni¹, LIU Xiu^{1,2}, XIANG Qin³, HUANG Qiuqing¹, ZOU Junju¹, YU Rong^{1,2*}

1. School of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Prescription and Syndromes Translational Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Office of Science & Technology, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

[Abstract] **Objective** To study the effects of Danggui Shaoyao San (DSS) on the intestinal flora of mice with diabetic nephropathy (DN). **Methods** Thirty 8-week-old male db/db mice and six 8-week-old male db/m mice were selected. Fasting blood glucose (FBG) and urinary albumin to creatinine ratio (UACR) were measured, and the qualified db/db mice were randomized into five groups: model (MOD) group (distilled water 0.1 mL/10 g), dapagliflozin (DAPA) group (dapagliflozin tablets 1.3 mg/kg), low-dose DSS (DSS-L) group (8.39 g/kg), medium-dose DSS (DSS-M) group (16.77 g/kg), and high-dose DSS (DSS-H) group (33.54 g/kg), with six mice in

[收稿日期]2024-09-13

[基金项目]国家自然科学基金项目(U21A20411, 82074400);湖南省自然科学基金创新研究群体项目(2024JJ1007);湖南中医药大学学科建设“揭榜挂帅”项目(22JBZ002);湖南省研究生科研创新项目(CX20220778)。

[通信作者]* 喻 嵘,女,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:yurong@21.cn.com。

each group. The six db/m mice served as the blank control (CON) group (distilled water 0.1 mL/10 g). Then FBG and insulin tolerance in mice were measured. Blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (Scr) were measured by ELISA, and UACR was detected by fully automatic biochemical analyzer. Samples of the mouse renal and small intestinal tissues were taken for HE staining, and feces in the mouse colon was selected for 16S rRNA sequencing. **Results** Compared with the CON group, the MOD group had lower glucose tolerance and higher levels of FBG, BUN, Scr, and UACR ($P<0.01$). Compared with the MOD group, the DSS group exhibited increased glucose tolerance ($P<0.01$), decreased levels of FBG, BUN, Scr, and UACR ($P<0.01$), and reduced pathological damage to the kidney and small intestine. The study on the intestinal flora diversity show that compared with the CON group, the MOD group had a lower diversity of intestinal flora. Compared with the MOD group, the flora differences between the DSS-M group and the CON group were smaller. In terms of the species composition of the flora, the relative abundance of *Akkermansia muciniphila* in the DSS-M group of mice was significantly higher ($P<0.01$). **Conclusions** DSS can significantly increase the abundance of *Akkermansia muciniphila* in the intestines of db/db mice with DN, which may be one of the mechanisms by which it improves DN.

[**Keywords**] diabetic nephropathy; Danggui Shaoyao San; intestinal flora; circulating blood and draining water retention; diabetes; 16S rRNA; Chinese medicine

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)为糖尿病引发的全身微血管病变影响肾脏部位的并发症,因糖代谢持久异常引起肾小球毛细血管基膜增厚,导致弥漫性或结节性肾小球硬化^[1]。DN的病机多为阴虚燥热、肾虚水泛,瘀血常为其重要的病理因素^[2]。中药对DN的保护和治疗作用的相关研究逐年增多,涉及复方、单味中药、中药提取物及中药活性化合物等^[3]。当归芍药散(Danggui Shaoyao San, DSS)是《金匱要略·妇人妊娠病脉证并治第二十》中的名方,方由当归、芍药、茯苓、泽泻、白术、川芎6味药组成。方中川芎、当归、芍药补血祛瘀,当归、川芎并可疏利气机;茯苓、白术健脾益气,合泽泻淡渗利湿。全方气、血、水同治,共奏补血活血、利水祛湿之功,与DN病机契合。有研究表明,DSS可能通过改善大鼠的氧化应激水平或足细胞损伤减轻肾脏病理损伤^[4-5]。DSS能有效改善DN患者的一系列临床表现,如减少水肿、尿蛋白等^[6-8]。

肠道菌群失调在DN的发生发展中起重要作用^[9]。目前,以肠道菌群为靶点从中药中寻找治疗DN的单体成分与复方已经成为开发新药的新方向^[10]。肠道菌群协助人体消化吸收的功能与中医学脾主运化相应^[11]。当运化功能失调时,人体代谢系统出现异常,对机体产生负面影响。肾与脾的关系密切,肾精以禀赋先天之精为主,又赖以脾胃化生的后天之精滋养,肠道菌群的功能部分属于脾的范畴,有学者将肠、肾的联系总结为“肠-肾轴”^[12]。为进一步探索相关机制,本实验研究DSS对db/db小鼠的糖代谢、肾功能、肾脏及肠道病理损伤方面的影响,并对小鼠的肠道菌群进行16S rRNA基因测序分析,以期寻

找DSS改善DN的菌群靶点以及作用途径。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级雄性6周龄db/db小鼠(C57BLKS/J),体质量(35±2)g,雄性6周龄db/m小鼠(C57BLKS/J),体质量(23±2)g,均购自江苏华创信诺医药科技有限公司,许可证号SCXK(苏)2020-0009。将所有小鼠饲养在SPF级动物实验室中,动物房保持恒定温度(25±0.5)℃和湿度(50%±5%)环境,均用普通饲料喂养,饲料由协同生物有限公司提供。所有动物实验均根据湖南中医药大学实验动物护理和使用指南执行,伦理审批编号为LL2023042602。

1.2 药物与主要试剂

从湖南中医药大学第一附属医院门诊中药房购入当归、白芍、茯苓、白术、泽泻、川芎,批号依次为TH22101801、TH22082301、CK22102401、2022083104、HY22092803、GW23031301。以《金匱要略·妇人妊娠病脉证并治第二十》中原方比例(当归:白芍:茯苓:白术:川芎:泽泻=3:16:4:4:8:8)称取药材共129g。按db/db小鼠灌胃给药6周时间计算所需的中药药材量,将所有药材放入锅中,倒入蒸馏水浸泡30min后,倒入8倍蒸馏水煎煮30min,倒出药液,第二次加入6倍蒸馏水煎煮30min,将两次的药液混合均匀,将滤液蒸发浓缩至含生药量3g/mL的DSS药汤中,倒出放冷分装,放置于4℃冰箱备用。

达格列净片(规格:10mg×14片,美国阿斯利康制药公司,批号:H20170119);氯化钠注射液(规格:100mL:0.9g,湖南科伦制药有限公司,批号:

H43020456);50%葡萄糖溶液(规格:20 mL:10 g,贵州天地药业有限公司,批号:H20065510);胰岛素溶液(规格:10 mL:400 U×2支,江苏万邦生化医药集团有限责任公司,批号:H10890001)。

肌酐比色法试剂盒、尿素氮比色法试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号:E-BC-K188-M、E-BC-K183-M);4%多聚甲醛组织固定液、电镜液、中性树胶(兰杰柯科技有限公司,批号:BL539A、BL911A、BL704A);二甲苯(AR级)、无水乙醇(AR级)(中国医药集团有限公司,批号:10023418、100092680);苏木素染液(武汉塞维尔生物科技有限责任公司,批号:G1004);伊红染液(合肥博美生物科技有限责任公司,批号:YE2080);盐酸(AR级)(成都市科隆化学制品有限公司,批号:7647-01-0)。

1.3 主要仪器

血糖仪及试纸(三诺生物传感股份有限公司,型号:GA-3);台式高速冷冻离心机、台式低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,型号:H1650R、TDZ4-WS);Spark多功能酶标仪(瑞士帝肯公司,型号:30086376);超低温冰箱(德国艾本德股份公司,型号:CryoCube F570);超纯水仪(威立雅水处理技术有限公司,型号:PURELAB Chorus 1 complete);水浴锅(上海博讯医疗生物仪器股份有限公司,型号:SSW-420);电子天平(上海精密科学仪器有限公司,型号:YP1002N)。

1.4 实验动物的饲养、分组及给药

在动物房适应性喂养1周,所有小鼠均喂食同样的饲料和水,对所有实验鼠连续两日进行空腹血糖(fasting blood glucose,FBG)检测,检测结束后,使用实验室提供的代谢笼接收小鼠24 h尿液。尿液样本在采集后2 h内送检,如未及时送检,冷藏保存于4℃冰箱内,避免尿液成分变质或被破坏。对采集的尿液样本进行尿白蛋白/肌酐比值(urinary albumin to creatinine ratio,UACR)检测后,将FBG≥11.1 mmol/L,且UACR>30 mg/g的db/db小鼠选入实验组,30只小鼠均造模成功。

采用随机数字法将db/db小鼠分为5组,每组6只,分别为模型(MOD)组,DSS低剂量(DSS-L)、中剂量(DSS-M)、高剂量(DSS-H)组,达格列净(DAPA)组。6只db/m小鼠为空白对照(CON)组。

按人和动物间体表面积的等效剂量比值^[13]换算,

DSS-M组灌胃剂量为 $9.1 \times 129 \text{ g}/70 \text{ kg} = 16.77 \text{ g/kg}$,用3 g/mL的生药液灌胃,灌胃体积0.06 mL/10 g;按1:2:4比例计算,DSS-L组和DSS-H组灌胃剂量分别为8.39、33.54 g/kg;达格列净片按10 mg/d成人剂量换算,DAPA组灌胃剂量为1.3 mg/kg。MOD组与CON组按0.1 mL/10 g用蒸馏水灌胃。所有实验小鼠持续灌胃给药6周,定时1 d/次。

1.5 FBG测定、胰岛素耐量试验

每日观察小鼠状态。给鼠笼更换洁净垫料后,断食不断水8 h,用血糖试纸采集尾端静脉血后插入血糖仪,屏幕数值即FBG,每周测定一次。

灌胃结束时,确定小鼠身体状况良好,再进行胰岛素耐量试验(insulin tolerance test,ITT),更换洁净垫料后,禁食不禁水,空腹3~5 h。0 min的血糖值,记为H0,按小鼠体质量腹腔注射1 U/kg的胰岛素溶液,开始计时后,在30、60、90、120 min时间点检测小鼠血糖,分别记为H30、H60、H90、H120,画出血糖曲线并计算葡萄糖曲线下面积(area under the curve, AUC),AUC值通过GraphPad Prism 9.5.0进行计算。

1.6 UACR、BUN、Scr检测

DN患者中,UACR、血肌酐(serum creatinine,Scr)、血尿素氮(blood urea nitrogen,BUN)指标常病理性增高^[14]。末次给药后,将所有实验小鼠放入实验室提供的代谢笼中,用全自动生化分析仪检测小鼠24 h尿液中的UACR值。用肌酐比色法试剂盒、尿素氮比色法试剂盒检测小鼠Scr、BUN。

1.7 肾脏、小肠组织染色

麻醉小鼠后进行眼眶取血,完成后迅速处死小鼠,取出肾脏和小肠后分别装入EP管中,并放入4%多聚甲醛液固定。将肾脏和小肠组织按常规石蜡包埋制备4 μm组织切片,制作HE、Masson切片。

1.8 小鼠肠道菌群16S rRNA测序与分析

CON组、MOD组和DSS-M组(前期生化结果分析发现DSS-M组疗效较明显,因此仅选择DSS-M组进行16S rRNA测序)小鼠的粪便样本委托广州基迪奥生物科技有限公司进行扩增测序。使用基迪奥生物软件进行菌群多样性、物种组成及差异分析。通过Sobs、Chao1、ACE和Shannon指数对小鼠肠道菌群进行α多样性分析。其中,Sobs指数表示检测到的菌群操作分类单元(operational taxonomic units,

OTU)个数;Chao1和ACE指数表示预测的菌群 OTU 个数;Shannon 指数综合体现肠道菌群的丰富度和均匀度。选择与 DN 密切相关的 4 个生化指标 FBG、BUN、Scr、UACR 与 CON 组、MOD 组和 DSS-M 组属水平菌群的相对丰度进行环境因子分析。使用冗余分析(redundancy analysis, RDA)展示环境因子、物种、样本三者之间的关系。对选取的环境因子和菌属进行相关性分析,绘制 Spearman 相关性网络图和相关性热图,从而得出环境因子和某个菌属的相关密切程度。

1.9 统计学分析

各组数据采用 GraphPad Prism 9.5.0 和 SPSS 25.0 软件进行分析,实验结果全部采用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。符合正态分布和方差齐性的数据,使用单因素方差分析方法进行多重比较;不符合正态分布或方差齐性者,使用非参数检验方法进行比较。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

在肠道菌群 16S rRNA 基因测序中,使用 qiime 软件进行 α 多样性指数分析。在 β 多样性分析中,基于样本间的 Jaccard 距离,使用 R 语言 vegan 包,进行非加权组平均法(unweighted pair group method with arithmetic mean,UPGMA)分析,将距离较小的样本合并为一簇。使用 R 语言 vegan 包进行主坐标分析(principal coordinate analysis,PCoA)。使用 R 语言 ropls 包进行偏最小二乘判别分析(partial least squares discrimination analysis,PLS-DA)。使用 R 语言 labdsv 包计算比较各物种在 CON 组、MOD 组和 DSS-M 组之间的 indicator value,并使用交叉验证进行统计检验,获得 P 值,设置 $P<0.05$ 为筛选阈值。使用 PICRUST2 2.5.1 软件比对 KEGG 数据库对肠道菌群的功能通路进行预测。

2 结果

2.1 DSS 对 db/db 小鼠基本情况的影响

灌胃给药 6 周后,CON 组小鼠饮食量、体质量基本稳定,皮毛顺滑有光泽,大小便正常。与 CON 组比较,MOD 组小鼠饮食量减少,体质量显著增加,行动迟缓,皮毛油腻、脱毛,身体肥大。

2.2 DSS 对 db/db 小鼠体质量的影响

给药前,与 CON 组比较,其余各组体质量显著上升($P<0.01$)。给药后,与 MOD 组比较,DSS-L 组、

DSS-M 组、DSS-H 组体质量明显降低($P<0.05$)。详见表 1。

表 1 各组小鼠体质量比较($\bar{x}\pm s, n=6, g$)

Table 1 Comparison of mouse body weight among various groups ($\bar{x}\pm s, n=6, g$)

组别	给药前体质量	给药后体质量
CON 组	27.80±1.69	30.75±1.82
MOD 组	41.30±2.19**	49.85±4.55**
DAPA 组	42.22±2.12**	45.25±2.94
DSS-L 组	42.02±2.2**	41.17±4.71 [#]
DSS-M 组	40.60±2.33**	40.87±4.42 [#]
DSS-H 组	40.56±2.19**	42.08±6.09 [#]

注:与 CON 组比较,** $P<0.01$;与 MOD 组比较,[#] $P<0.05$ 。

2.3 DSS 对 db/db 小鼠 FBG 和 ITT 的影响

给药前,与 CON 组比较,其余各组 FBG 上升($P<0.01$)。给药后,与 CON 组比较,其余各组 FBG、ITT-AUC 明显上升($P<0.01$);与 MOD 组比较,DAPA 组、DSS-M 组、DSS-H 组 FBG 和 ITT-AUC 明显降低($P<0.01$),DSS-L 组 FBG 降低($P<0.01$);与 DAPA 组比较,DSS-L 组($P<0.01$)和 DSS-H 组($P<0.05$)的 FBG 增高,DSS-L 组 ITT-AUC 增高($P<0.05$);与 DSS-L 组比较,DSS-M 组的 ITT-AUC 降低($P<0.05$)。详见表 2。

表 2 各组小鼠 FBG、ITT 比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Comparison of FBG and ITT levels among various groups ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	给药前 FBG/ (mmol·L ⁻¹)	给药后 FBG/ (mmol·L ⁻¹)	ITT-AUC
CON 组	5.42±0.77	5.03±1.05	527.5±17.98
MOD 组	23.38±5.96**	27.90±3.75**	3 060±197.1**
DAPA 组	22.32±3.47**	14.20±1.61** ^{###}	1 908±307.9** ^{###}
DSS-L 组	22.97±5.05**	21.48±1.89** ^{###} ▲	2 534±85.22**▲
DSS-M 组	23.92±5.99**	18.55±5.01** ^{###}	1 965±136.4** ^{###} ■
DSS-H 组	23.57±5.77**	20.32±3.98** ^{###} ▲	2 245±247.2** ^{###}

注:与 CON 组比较,** $P<0.01$;与 MOD 组比较,^{###} $P<0.01$;与 DAPA 组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;与 DSS-L 组比较,■ $P<0.05$ 。

2.4 DSS 对 db/db 小鼠 UACR、Scr、BUN 的影响

与 CON 组比较,MOD 组 UACR、Scr、BUN 明显升高($P<0.01$)。与 MOD 组比较,DAPA 组和 DSS 各组小鼠 UACR、Scr、BUN 均明显下降($P<0.01$)。详见表 3。

2.5 DSS 对 db/db 小鼠肾脏、小肠组织病理损伤的影响

CON 组小鼠肾小球及周围肾小管形态结构正常,未见明显病理变化。与 CON 组比较,MOD 组小

表3 各组小鼠 UACR、Scr、BUN 比较($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 3 Comparison of UACR, Scr and BUN levels among various groups ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	UACR/(mg·g ⁻¹)	Scr/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	BUN/(mmol·L ⁻¹)
CON 组	9.16±2.12	14.87±2.39	6.47±0.75
MOD 组	203.59±38.04**	36.40±2.34**	14.64±2.67**
DAPA 组	80.03±8.94***#	24.43±3.00***#	8.02±0.41#
DSS-L 组	85.05±24.35***#	28.50±2.78***#	9.69±0.55***#
DSS-M 组	73.03±10.28***#	24.75±2.76***#	8.10±0.63#
DSS-H 组	90.13±22.28***#	25.78±3.07***#	8.58±0.85#

注:与 CON 组比较,** $P<0.01$;与 MOD 组比较,# $P<0.01$ 。

鼠中部分肾小管、肾小球结构异常,炎性细胞浸润,血管球系膜细胞增生,毛细血管淤血,肾小管可见蛋白管型和白细胞管型,管腔内可见均质红染的物质和中性粒细胞,肾间质中有大量慢性炎细胞和纤维组织。与 MOD 组比较,DSS 组和 DAPA 组小鼠肾组织的病理损伤明显减轻,肾小球结构基本正常,血管球系膜细胞有轻微增生,毛细血管轻微淤血,肾小管上皮细胞结构正常,间质内未见明显充血、炎性细胞浸润和纤维组织增生。详见图 1。

CON 组小鼠小肠组织肠黏膜完整,肠绒毛形态完好、排列整齐,未见明显病理变化。与 CON 组比较,MOD 组小鼠的肠道结构完整性遭到破坏,淋巴细胞增多,肠绒毛紊乱和碎裂,且绒毛高度萎缩变

短,杯状细胞明显减少。与 MOD 组比较,DSS-L 组、DSS-M 组、DSS-H 组以及 DAPA 组小鼠肠腺上皮细胞肿胀及炎性细胞浸润均有不同程度缓解,肠绒毛排列较整齐,杯状细胞数量有所增加,以 DSS-M 组较为明显。详见图 2。

2.6 DSS 对 db/db 小鼠肠道菌群的影响

2.6.1 DSS 对 db/db 小鼠肠道菌群多样性的影响 根据 α 多样性分析的 Sobs、Chao1、ACE 指数结果可知,与 CON 组比较,DSS-M 组的菌群种类减少($P<0.05$);与 MOD 组比较,虽然 DSS-M 组有减少的趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$)。从 Shannon 指数结果分析,与 CON 组和 MOD 组比较,DSS-M 组的菌群丰富度和均匀度显著下降($P<0.01$)。

根据 β 多样性分析结果可知,在 UPGMA 聚类树中,CON 组和 DSS-M 组的样本处于同一枝;MOD 组样本均处于另一枝。PCoA 和 PLS-DA 分析结果显示,3 组样本分布于不同象限,分离趋势明显,且 CON 组和 DSS-M 组距离较近。详见图 3。

2.6.2 DSS 对 db/db 小鼠肠道菌群物种组成的影响

从门水平分析,与 CON 组比较,MOD 组小鼠的拟杆菌门(Bacteroidota)、疣微菌门(Verrucomicrobiota)的菌群相对丰度减少,厚壁菌门(Firmicutes)的相对丰度增加;与 MOD 组比较,DSS-M 组逆转了疣微菌

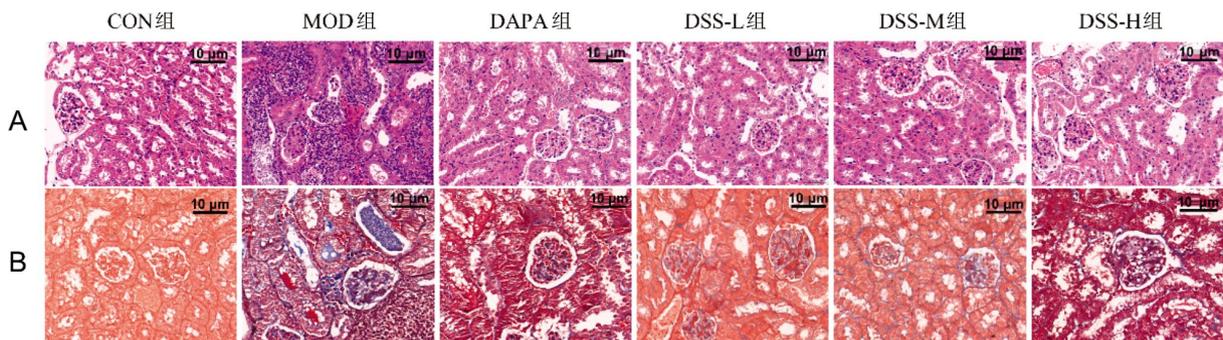


图1 各组小鼠肾脏组织病理结果

Fig.1 Pathological results of the renal tissues in each group of mice

注:A.HE 染色($\times 100$);B.Masson 染色($\times 100$)。

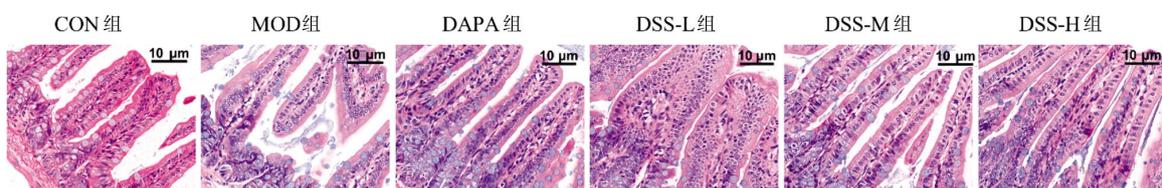


图2 各组小鼠小肠组织病理结果(HE, $\times 100$)

Fig.2 Pathological results of the small intestinal tissues in each group of mice (HE staining, $\times 100$)

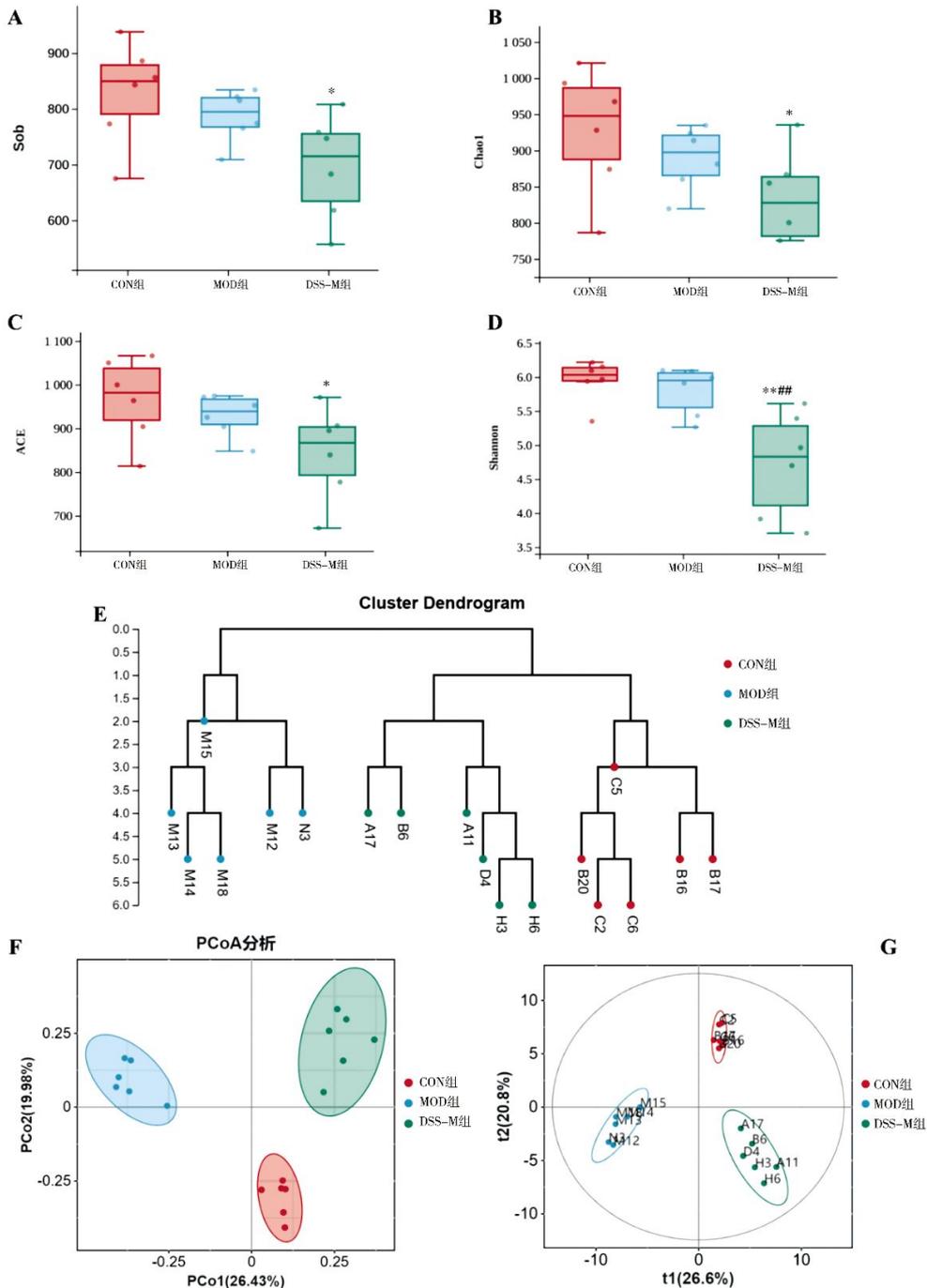


图3 各组小鼠肠道菌群的α和β多样性分析

Fig.3 Analysis of α and β diversity of intestinal flora in each group of mice

注:A.Sobs 指数;B.Chao1 指数;C.ACE 指数;D.Shannon 指数;E.UPGMA 聚类树;F、G.基于 Jaccard 算法、OTU 水平的 PCoA 和 PLS-DA 分析。与 CON 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 MOD 组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

门、厚壁菌门菌群相对丰度。此外,DSS-M 组小鼠肠道疣微菌门菌群的相对丰度为 35.26%,显著高于 CON 组和 MOD 组($P < 0.01$)。从科水平分析,与 CON 组比较,MOD 组小鼠的毛螺菌科(Lachnospiraceae)相对丰度显著增加,经 DSS 干预后,毛螺菌科的丰度被逆转;与 CON 组和 MOD 组比较,DSS-M 组小鼠鼠杆菌科(Muribaculaceae)相对丰度减少,而阿克

曼氏菌科(Akkermansiaceae)显著增加。从属水平分析,与 CON 组比较,MOD 组 *Lachnospiraceae_NK4A136_group* 的相对丰度明显增加,经 DSS 干预后,丰度被明显逆转;与 CON 组和 MOD 组比较,DSS-M 组的阿克曼氏菌属(*Akkermansia*)的相对丰度显著增加($P < 0.01$)。从种水平分析,与 CON 组和 MOD 组比较,DSS-M 组的嗜黏蛋白阿克曼氏菌(*Akkermansia*

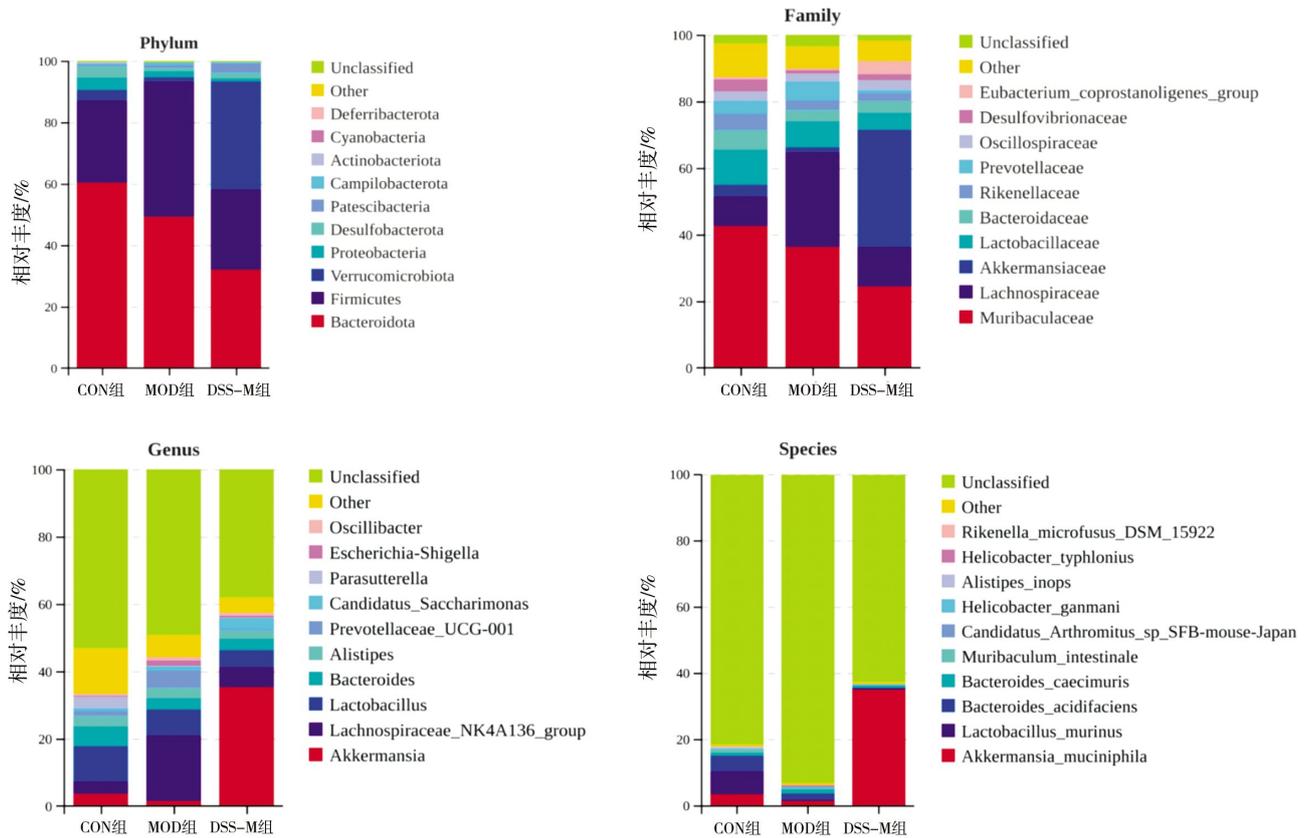


图 4 各组小鼠肠道菌群在门、科、属、种水平上的相对丰度

Fig.4 Relative abundance of intestinal flora in each group of mice at phylum, family, genus, and species levels

muciniphila) 相对丰度显著增加 ($P < 0.01$)。详见图 4。

2.6.3 DSS 对 db/db 小鼠肠道菌群指示物种的影响

本研究为寻找 CON 组、MOD 组和 DSS-M 组间的差异菌群进行线性判别分析效应大小 (linear discriminant analysis effect size, LEfSe) 比较 (图 5A), 展示不同组中丰度差异显著的物种。CON 组发现 60 个群落被选择性富集, 包括拟杆菌目 (Bacteroidales)、拟杆菌门、拟杆菌纲 (Bacteroidia)、拟杆菌科 (Muribaculaceae)、鼠乳杆菌 (*Lactobacillus_murinus*)、产酸拟杆菌 (*Bacteroides_acidifaciens*)、伯克霍尔德菌目 (Burkholderiales)、萨特菌科 (Sutterellaceae)、副萨特菌属 (*Parasutterella*) 等。MOD 组发现 34 个群落被选择性富集, 包括梭菌纲 (Clostridia)、毛螺菌科、毛螺目 (Lachnospirales)、普雷沃菌科 (Prevotellaceae)、*Prevotellaceae_UCG_001*、*Diaphorobacter*、*Diaphorobacter_polyhydroxybutyrativorans*。DSS-M 组富集在阿克曼氏菌属、疣微菌目 (Verrucomicrobiales)、疣微菌纲 (Verrucomicrobiae)、阿克曼氏菌科、疣微菌门、嗜黏蛋白阿克曼氏菌、颤螺旋目 (Oscillospirales)、产粪甾醇真杆菌科 (Eubacterium_coprostanoligenes_group)、

Christensenella、*Akkermansia_sp_KLE1798* 等 16 个群落。以气泡图展示不同分类水平上各组的差异菌种, 在门水平上, 拟杆菌门、厚壁菌门、疣微菌门和脱硫菌门 (Desulfobacterota) 是主要的差异物种; 在种水平上, 嗜黏蛋白阿克曼氏菌、鼠乳杆菌、产酸拟杆菌等是主要的差异菌群。详见图 5B、5C。

2.6.3 DSS 对 db/db 小鼠肠道菌群影响的 KEGG 通路富集分析 结合 KEGG 功能聚类分析发现, 预测 Level-2 层级共有 30 种子功能类别, 其中以代谢相关功能通路为主, 共 11 条。将代谢相关通路进行统计分析。组间差异显著的代谢通路包括糖代谢、萜类化合物和聚酮类化合物的代谢、类脂化合物代谢、能量代谢、其他次生代谢物的生物合成、外源性生物降解和代谢、核苷酸代谢。详见图 6。

2.6.4 肠道菌群与 FBG、BUN、Scr、UACR 水平的相关性分析 RDA 分析结果显示, FBG、BUN、Scr、UACR 的水平显著影响各组小鼠的菌落组成 (图 7A)。从相关性热图和网络图展现出的结果分析, 在属水平上, 4 种因子与菌群的相关关系较一致 (图 7B、C)。FBG 水平与副萨特菌属、*Rikenellaceae_RC9_gut_*

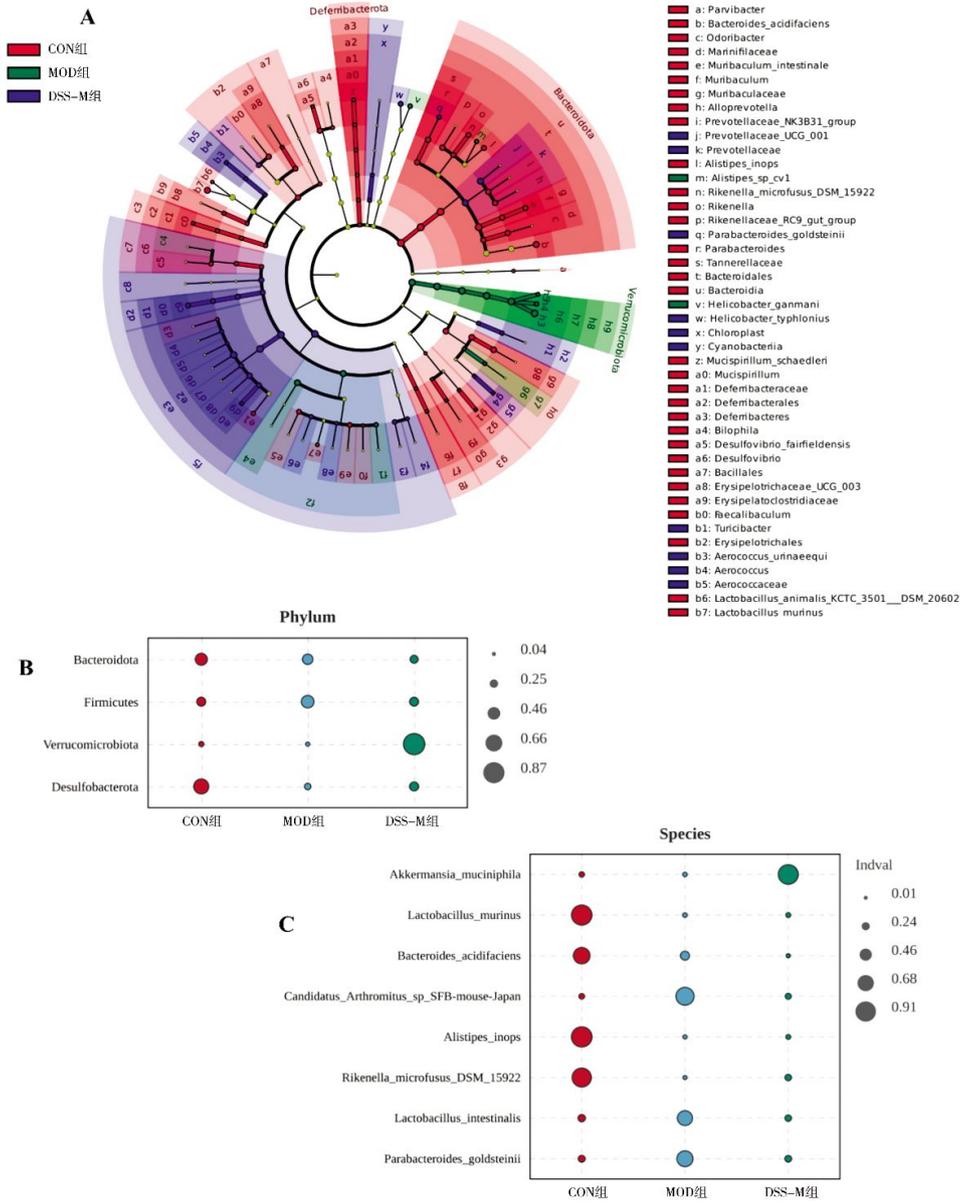


图5 各组小鼠肠道菌群指示物种分析

Fig.5 Indicator analysis of the intestinal flora in each group of mice

注:A.LEISe 分析生成的进化分支图,在进化分支图中由内至外辐射的圆圈代表由门至属(或种)的分类级别,小圆圈直径大小与相对丰度大小呈正比;B.门水平指示物种气泡图($P \leq 0.05$);C.种水平指示物种气泡图($P \leq 0.05$)。

group、*Odoribacter* 呈负相关,与 *Lachnospiraceae_NK4-A136_group*、*Lachnospiraceae_UCG-006*、*Prevotellaceae_UCG-001* 呈正相关;UACR 与副萨特菌属、*Rikenellaceae_RC9_gut_group*、*Odoribacter*、*Prevotellaceae_NK3B31_group*、脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)呈负相关,与 *Lachnospiraceae_NK4A136_group*、*Lachnospiraceae_UCG-006*、*Prevotellaceae_UCG-001* 呈正相关;Scr、BUN与副萨特菌属、*Rikenellaceae_RC9_gut_group*、*Odoribacter*、*Prevotellaceae_NK3B31_group*、副拟杆菌属(*Parabacteroides*)呈负相关,与 *Lachnospiraceae_NK4A136_group*、*Lachnospiraceae_UCG-006* 呈正相关。

3 讨论

DSS 除治疗“腹中痛”外,还用于治疗消化、肾脏系统等疾病^[15]。针对 DN 水液内停、肾络瘀阻的病机特点^[16],可用活血利水方 DSS 治疗。与 CON 组相比,MOD 组小鼠体质量、FBG、ITT-AUC、UACR、Scr、BUN 显著增高。与 MOD 组相比,DAPA 组和 DSS 组上述指标均显著下降,且基于本实验结果,相比于

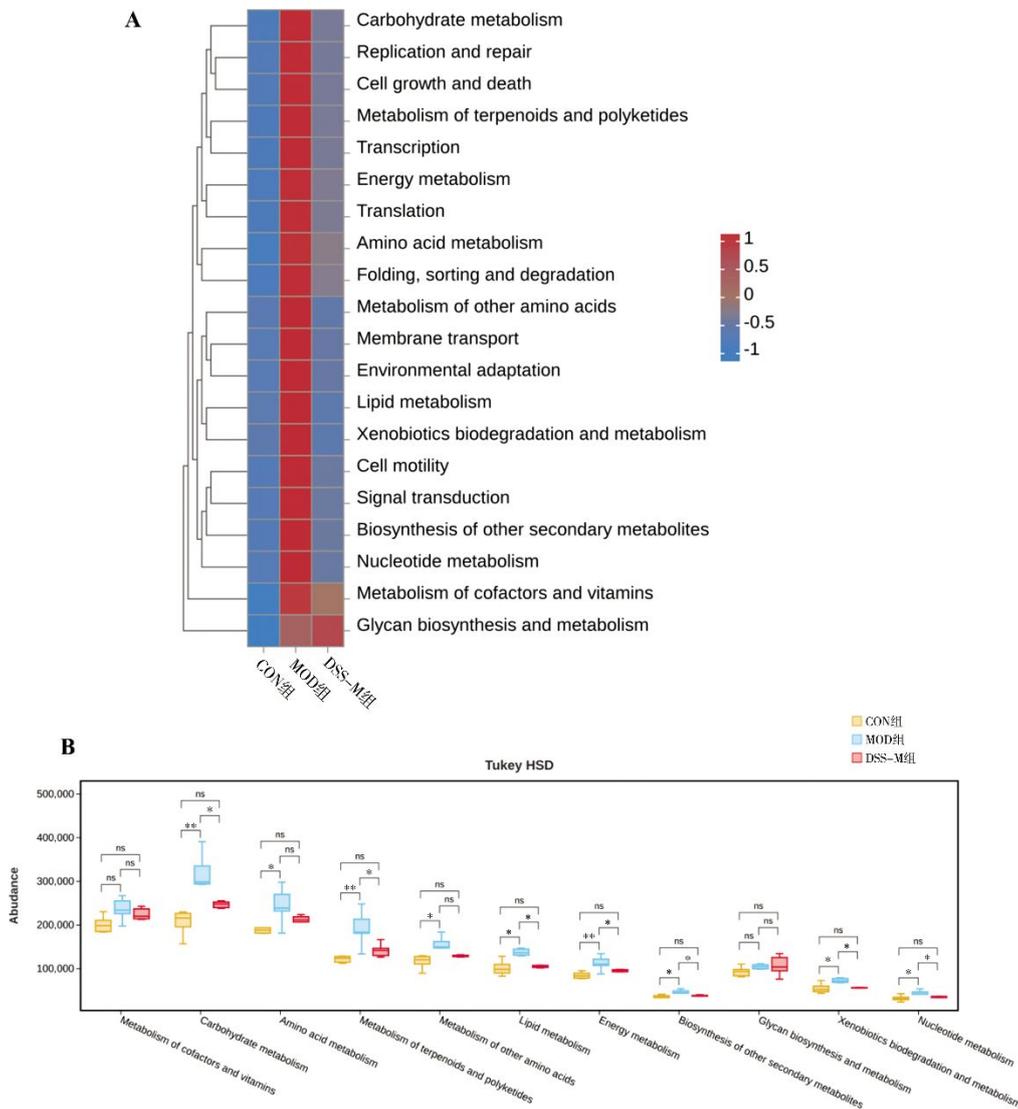


图 6 PICRUSt 群落功能预测
Fig.6 PICRUSt community function prediction
 注:A.功能丰度热图(前 20);B.KEGG 通路 Tukey HSD 统计检验。

DSS,DAPA 可能对 db/db 小鼠体质量的影响较小。从病理损伤程度上分析,与 MOD 组相比,DSS 组和 DAPA 组小鼠的肾组织和肠黏膜的结构损伤明显减轻。由上述结果可知,DSS 能降低 db/db 小鼠血糖,保护其肾功能以及减轻肠道损伤。

本研究观察到 DSS-M 组小鼠的 α 多样性指数比 MOD 组更低,尤其是 Shannon 指数显著下降,不排除 DSS 中含有抗菌活性成分从而导致 DSS-M 组小鼠的肠道菌群丰度下降。从 DSS 中的泻泻中分离出来的 23-乙酰泻泻醇 B 等,表现出有效的抗菌活性,经 23-乙酰泻泻醇 B 干预后的肥胖模型小鼠,与肥胖模型小鼠比较,其肠道菌群丰度也具有下降趋势^[17]。然而,在 β 多样性分析中,三组表现出明显的聚类分离,说明虽然 DSS-M 组仍与 MOD 组有明显

差异,且与 CON 组接近,DSS 仍可以部分纠正 db/db 小鼠的肠道菌群结构。在 DSS 对 db/db 小鼠肠道菌群物种组成的影响分析中发现,与 MOD 组相比,DSS 能够特异性增加嗜黏蛋白阿克曼氏菌的相对丰度。指示物种分析结果发现,在属水平上,阿克曼氏菌属、*Lachnospiraceae_NK4A136_group*、*Odoribacter* 等是主要的差异菌属;在种水平上,嗜黏蛋白阿克曼氏菌是最主要的差异菌。作为一种有益菌,有许多证据表明嗜黏蛋白阿克曼氏菌丰度降低与肥胖、糖尿病、炎症等多种疾病有关^[18]。以上结果表明,DSS 能显著性增加有益菌嗜黏蛋白阿克曼氏菌的丰度,这可能与其改善 DN 的机制有关。

在功能分析中发现,MOD 组小鼠与新陈代谢相关的通路显著上调,主要是糖代谢、萜类化合物和聚

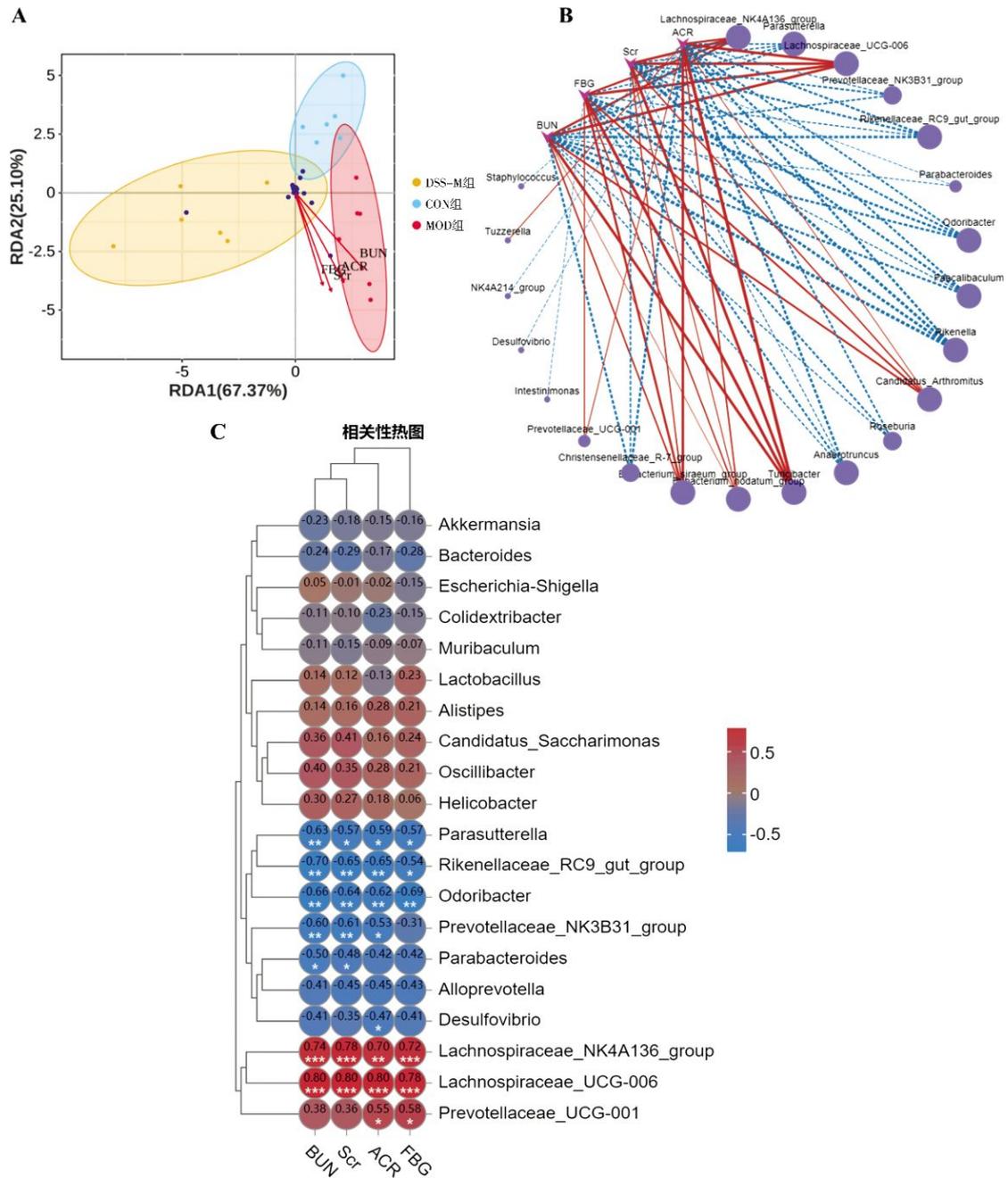


图7 物种-环境的关联分析

Fig.7 Species-environment correlation analysis

注:A.RDA分析;B.Genus水平相关性网络图;C.Genus水平相关性热图,P值表示物种与目标环境因子的显著性水平,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.0001$ 。

酮类化合物的代谢、类脂化合物代谢、能量代谢等通路,且在DSS-M组中部分逆转。DN的发生发展与糖脂代谢紊乱密切相关^[19]。而在属水平的环境因子分析结果中发现,副萨特菌属、*Rikenellaceae_RC9_gut_group*、*Odoribacter*等与db/db小鼠的FBG、BUN、Scr、UACR呈负相关;*Lachnospiraceae_NK4A136_group*、*Lachnospiraceae_UCG-006*等与上述指标呈正相关。与环境因子呈负相关的可能是改善DN的有益菌属,比如副萨特菌属在人和小鼠肠胆汁酸维持和胆

固醇代谢过程中发挥潜在作用^[20]。*Rikenellaceae_RC9_gut_group*与参与短链脂肪酸吸收和代谢呈正相关^[21]。*Odoribacter*的缺失可导致短链脂肪酸可用性降低^[22]。

本研究仅对db/db小鼠肠道菌群的结构和功能进行了分析和预测,尚未研究DSS与db/db小鼠肠道代谢产物的关系及其作用途径。本课题组已对DSS对于DN小鼠的作用在转录组学层面进行了分析研究^[23],多组学联合分析相比单一组学分析更能

反应机体物质的代谢途径,本课题组将进行进一步研究。

综上所述,DSS 在治疗 db/db 小鼠方面表现出一定的疗效,显著增加嗜黏蛋白阿克曼氏菌的丰度可能是其改善 DN 的机制之一。

参考文献

- [1] OSHIMA M, SHIMIZU M, YAMANOUCI M, et al. Trajectories of kidney function in diabetes: A clinicopathological update[J]. *Nature Reviews Nephrology*, 2021, 17(11): 740-750.
- [2] 陈大舜, 喻 嵘. 中西医结合糖尿病学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2017: 87-97.
- [3] LIU X J, HU X K, YANG H, et al. A review of traditional Chinese medicine on treatment of diabetic nephropathy and the involved mechanisms[J]. *The American Journal of Chinese Medicine*, 2022, 50(7): 1739-1779.
- [4] 李晓冰, 任玉梅, 张立赞, 等. 当归芍药散对糖尿病早期肾损伤大鼠氧化应激的影响[J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(9): 2082-2084.
- [5] QIN M, ZHANG T Z. Danggui Shaoyaoan attenuates doxorubicin induced Nephrotic Syndrome through regulating on PI3K/Akt Pathway[J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2023, 23(2): 148.
- [6] 汪六林, 李 刚, 程 虹, 等. 当归芍药散治疗IV期糖尿病肾病的临床效果[J]. *广西医学*, 2019, 41(15): 1910-1913.
- [7] 陈华平, 宋恩峰, 梅莎莎. 免煎中药当归芍药散治疗早期糖尿病肾病临床观察[J]. *湖北中医药大学学报*, 2015, 17(4): 68-69, 70.
- [8] 张立赞, 赵云芳, 王翼华, 等. 加味当归芍药散方对糖尿病早期肾损害保护机理探讨[J]. *实用中医内科杂志*, 2011, 25(1): 26-28.
- [9] 王 勤, 杨亦彬. 肠道菌群失调对糖尿病及糖尿病肾病影响的研究进展[J]. *医学综述*, 2019, 25(3): 530-534.
- [10] 彭岚玉, 李定祥, 姚敬心, 等. 基于肠道菌群及其代谢产物 SCFA 探讨左归降糖通脉方对 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2024, 44(3): 365-373.
- [11] 刘 旭, 刘雷蕾, 吴 瑜. 中医脾藏象与肠道菌群的相关性研究进展[J/OJ]. *中国中西医结合外科杂志*, 1-5[2024-11-20].<https://http-kns.cnki.net/hnucm.opac.vip/kcms/detail/12.1249.R.20241115.0914.008.html>.
- [12] RITZ E. Intestinal-renal syndrome: Mirage or reality?[J]. *Blood Purification*, 2011, 31(1/2/3): 70-76.
- [13] 徐叔云, 卞如濂. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 62.
- [14] 李 平, 谢院生. 糖尿病肾病中西医结合诊疗与研究[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2018: 130.
- [15] 李 鸿, 黎 柳, 黄秋晴, 等. 当归芍药散古今源流及临床应用机制[J]. *世界中医药*, 2024, 19(16): 2448-2454.
- [16] 赵宗江, 豆小妮, 张新雪. 糖尿病肾病“肾痿”假说探讨[J]. *中医杂志*, 2011, 52(S1): 8-10.
- [17] 吴 珍. 23-乙酰泽泻醇 B 对肥胖模型小鼠糖脂代谢紊乱及肠道菌群的研究[D]. 广州: 广东药科大学, 2021.
- [18] 黄桥深, 张永康, 汪水平, 等. 嗜黏蛋白阿克曼氏菌治疗疾病的潜力与作用机制研究进展[J]. *微生物学报*, 2023, 63(9): 3360-3373.
- [19] 陈小永, 宋军营, 王自闯. 炎症和氧化应激在糖尿病肾病中的作用[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(24): 6254-6256.
- [20] JU T T, KONG J Y, STOTHARD P, et al. Defining the role of Parasutterella, a previously uncharacterized member of the core gut microbiota[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13(6): 1520-1534.
- [21] 徐 卓, 项 想, 尚尔鑫, 等. 丹参茎叶总酚酸对 2 型糖尿病肾病小鼠肠道菌群和短链脂肪酸的调节作用[J]. *药学报*, 2021, 56(4): 1035-1048.
- [22] GOMEZ-ARANGO L F, BARRETT H L, MCINTYRE H D, et al. Increased systolic and diastolic blood pressure is associated with altered gut microbiota composition and butyrate production in early pregnancy[J]. *Hypertension*, 2016, 68(4): 974-981.
- [23] 黄秋晴, 黎 柳, 李 鸿, 等. 基于转录组学探讨当归芍药散对 db/db 小鼠肾脏保护作用的潜在机制[J]. *湖南中医药大学学报*, 2024, 44(6): 967-975.

(本文编辑 周 旦)