

本文引用: 彭岚玉, 李定祥, 姚敬心, 罗政, 邓奕辉. 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.

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

彭岚玉, 李定祥, 姚敬心, 罗政, 邓奕辉*

湖南中医药大学, 湖南长沙 410208

[摘要] 目的 基于肠道菌群及代谢产物短链脂肪酸(short-chain fatty acid, SCFA)探讨左归降糖通脉方(Zuogui Jiangtang Tongmai formula, ZJTF)干预 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)的可能机制。方法 取 12 只 SD 大鼠为空白(Control)组, 喂食普通饲料;48 只大鼠为造模组, 以高脂饲料联合链脲佐菌素(streptozocin, STZ)制备 T2DM 模型。造模成功后随机分为模型(DM)组、ZJTF 低剂量(ZJTF.L, 12 g·kg⁻¹)组、ZJTF 高剂量(ZJTF.H, 24 g·kg⁻¹)组、二甲双胍 150 mg·kg⁻¹+阿托伐他汀 10 mg·kg⁻¹(MA)组, 药物干预 4 周。监测大鼠精神状态、体质量与随机血糖;ELISA 检测血清胰岛素(insulin, INS)、糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin, HbA1c)、炎症因子的水平;生化分析法检测血脂常规含量;HE 染色观察结肠病理改变;16SrRNA 观察肠道菌群结构;GC-MS 检测血清 SCFA 水平。结果 与 Control 组比较, DM 组出现多饮、多食、多尿、体质量减轻等症状;血糖、INS、HbA1c 明显上升($P<0.01$);总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)水平升高, 高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)明显降低($P<0.01$);白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)水平均明显升高($P<0.01$);结肠固有层出现部分中断和消失, 细胞肿胀、绒毛紊乱。DM 组厚壁菌门和变形菌门、肠杆菌科、埃希菌-志贺菌属的相对丰度增加;血清乙酸、丁酸含量下降($P<0.05$, $P<0.01$)。与 DM 组比较, ZJTF 组血糖、INS、HbA1c 均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);TC、TG、LDL-C 明显降低, HDL-C 明显升高($P<0.01$);IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 水平明显降低($P<0.01$);结肠细胞肿胀及炎性浸润缓解;拟杆菌门和疣微菌门、乳酸菌科、阿克曼菌属丰度增加;血清丁酸、乙酸含量升高($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 左归降糖通脉方可能通过调节肠道菌群和 SCFAs 水平起到降血糖、稳血脂、减轻炎症反应的作用。

[关键词] 左归降糖通脉方; 2 型糖尿病; 肠道菌群; 短链脂肪酸; 糖脂代谢

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.03.004

Effects of Zuogui Jiangtang Tongmai Formula on glucolipid metabolism in type 2 diabetic rats based on intestinal flora and its metabolite SCFA

PENG Lanyu, LI Dingxiang, YAO Jingxin, LUO Zheng, DENG Yihui*

Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

[Abstract] **Objective** To investigate the possible mechanism of Zuogui Jiangtang Tongmai Formula (ZGJTTF) in the intervention of type 2 diabetes mellitus (T2DM) based on intestinal flora and short-chain fatty acid (SCFA) of the metabolites. **Methods** Twelve SD rats were selected as control group and fed with ordinary diet. Forty-eight rats were used as the modeling

[收稿日期] 2023-7-21

[基金项目] 湖南省教育厅科学研究项目(21A0228); 湖南省中医药科研计划项目(E2022010); 湖南中医药大学中西医结合一流学科开放基金项目(2020ZXYJH31)。

[通信作者] * 邓奕辉, 女, 博士, 教授, 博士研究生导师, E-mail: dengyihui06@126.com。

group, and a T2DM model was prepared by combining high-fat diet with streptozocin (STZ). After successful modeling, they were randomized into model (DM) group, low-dose (ZGJTTF.L, $12 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and high-dose (ZGJTTF.H, $24 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) ZGJTTF groups, and metformin $150 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ + atorvastatin $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (M.A) group. Drug intervention lasted for 4 weeks. Mental state, body mass, and random blood glucose of rats were monitored. The levels of serum insulin (INS), glycosylated hemoglobin (HbA1c), and inflammatory factors were measured by ELISA. The routine content of blood lipid was determined by biochemical analysis. HE staining was used to observe the pathological changes of colon. The intestinal flora structure was observed by 16SrRNA. Serum SCFA levels were examined by GC-MS. **Results** Compared with control group, DM group showed symptoms such as polydipsia, polyphagia, polyuria, and decreased body mass. In addition, blood glucose, INS, and HbA1c significantly increased ($P<0.01$). Moreover, the levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) increased, while high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) significantly decreased ($P<0.01$). Besides, the levels of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) significantly increased ($P<0.01$). The lamina propria of the colon shows partial interruption and loss, with swelling cells and disordered villi. The relative abundance of Firmicutes and Proteobacteria, Enterobacteriaceae, and Escherichia Shigella increased in the DM group. In addition, the content of acetic acid and butyric acid in serum decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with DM group, blood glucose, INS, and HbA1c in ZGJTTF group significantly decreased ($P<0.01$). TC, TG, LDL-C also significantly decreased, while HDL-C significantly increased ($P<0.01$). The levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α significantly decreased ($P<0.01$). Besides, colon cell swelling and inflammatory infiltration were relieved. The abundance of Bacteroidetes, Verrucobacteria, Lactobacillaceae, and Akkermansia increased. The content of butyric acid and acetic acid in serum increased ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** ZGJTTF may play a role in lowering blood glucose, stabilizing blood lipid, and alleviating inflammation by regulating intestinal flora and SCFA levels.

[**Keywords**] Zuogui Jiangtang Tongmai Formula; type 2 diabetes; intestinal flora; short-chain fatty acid; glucolipid metabolism

糖尿病归属于中医学“消渴”范畴,其基本病机为“阴虚燥热,气虚血瘀”,病位上与脾(胃)、肺、肾相关^[1]。在藏象理论体系中,肠道属于脾胃的广义范畴,而中医学的脾胃功能又与肠道菌群及其代谢息息相关^[2]。肠道的微生物群数以万亿计、种类繁多,其作为连接外环境与机体内环境的桥梁,在健康与疾病中发挥至关重要的作用。脾为“后天之本”,主化气生血,为气机升降出入之枢纽。脾主升清,胃主降浊,协同运化水谷精微,供养机体。现代人生活节奏较快,饮食模式改变,多喜食肥甘厚味,加之缺乏运动,导致脾运化转输失司,中焦壅塞,气血、津液难以输布,肠道菌群无以滋养,结构紊乱,益生菌减少而条件致病菌增多^[3-4]。肠道稳态失调可导致过多的氧自由基、炎症因子释放,肠道通透性增加,肠道屏障功能破坏,菌群产生的内毒素、有害代谢物移位进入循环系统,诱导慢性代谢炎症的形成,影响肝脏的糖脂代谢及胰岛素抵抗,加速糖尿病的发展^[5-6]。

基于消渴的病因病机,课题组探索出具有滋阴益气、活血化瘀功效的左归降糖通脉方(Zuogui Jiang-

tang Tongmai Formula, ZJTTF)。ZJTTF由熟地黄、枸杞子、山茱萸、黄芪、黄连、地龙、丹参、川芎、水蛭和石菖蒲组成。方以熟地黄为君,滋肝肾之阴;黄芪为臣,补气助血运行;枸杞子、山茱萸滋补肾阴、地龙通经络,与血中气药川芎、活血祛瘀之丹参、逐瘀通经之水蛭为伍,发挥活血化瘀之效,佐以石菖蒲化痰开窍,黄连清热解毒。诸药合用,共奏滋阴益气、活血化瘀之功。课题组前期临床观察证实,ZJTTF降血糖肯定疗效^[7-8]。动物和细胞实验证实,ZJTTF可以调节血糖血脂代谢、降低血管内皮细胞损伤和促炎因子的表达^[9-10]。课题组的相关研究表明,肠道菌群稳态与2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)的生理机制密切相关^[11-12]。肠道菌群发酵产生的主要代谢产物短链脂肪酸(short-chain fatty acid, SCFA),被证实能维护肠道上皮屏障完整性及调节免疫稳态^[13]。但ZJTTF是否可以通过调节肠道菌群及其代谢产物SCFA来发挥抗糖尿病的功效还未验证。因此,本研究拟探讨ZJTTF对T2DM大鼠模型肠道菌群和SCFA的影响,为临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 实验动物

60只6~8周龄的SPF级健康雄性SD大鼠,体重(160±20)g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格证号:SCXK(湘)2019-0004。所有动物饲养于湖南中医药大学实验动物中心,温度(22±2)℃,相对湿度45%~55%,明/暗周期12h/12h,自由进食饮水。本实验经湖南中医药大学实验动物伦理委员会审批,编号:LL2021122903。

1.2 实验药物

ZJTF购于湖南中医药大学第一附属医院中药房,由熟地黄20g、枸杞子12g、山茱萸12g、黄芪30g、黄连10g、地龙12g、丹参20g、川芎12g、水蛭8g、石菖蒲8g组成,药物批号分别为熟地黄21120141B、枸杞子HH22011701、山茱萸SX22010601、黄芪CK22031502、黄连CK22022802、地龙2112252、丹参NG22021401、川芎CK22022801、水蛭202109-2302、石菖蒲2021121901。盐酸二甲双胍缓释片(每片0.5g,生产批号:201210302,正大天晴药业集团)、阿托伐他汀钙片(每片20mg,生产批号:FL34278,辉瑞制药有限公司)均购于湖南中医药大学第一附属医院西药房。

1.3 主要试剂与仪器

链脲佐菌素(streptozocin, STZ)(批号:S8050)、柠檬酸钠缓冲液(批号:C1013)、苏木素-伊红染色液(批号:G1120)均购自北京索莱宝科技有限公司;4%多聚甲醛(批号:BL539A,安徽白鲨生物科技有限公司);糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin, HbA1c)试剂盒(批号:H464-1,南京建成生物工程研究所);胰岛素(Insulin, INS)试剂盒(批号:CK-EN30973)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)试剂盒(批号:YD-30206)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)试剂盒(批号:ED-30219)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)试剂盒(批号:CK-EN31063)均购自厦门仑昌硕生物科技有限公司。

血糖测试仪(型号:ONE TOUCH Ultra Easy, 美国强生公司);台式冷冻离心机(型号:5418R/5702R, 湖南湘仪公司);组织包埋机(型号:TEC 6-EM-JC2, 日本SAKURA公司);切片机(型号:leica

UC-7, 德国徕卡公司);多功能酶标分析仪(型号:CYTATION3, 美国BioTek公司);气-质联用仪(型号:Agilent 7890A/5975C, 美国安捷伦公司)。

2 方法

2.1 T2DM大鼠模型的制备与分组

适应性饲养1周后,随机抽取12只SD大鼠为Control组,喂食普通饲料;其余48只大鼠为造模组,以高脂饲料(0.5%胆酸钠、2.5%胆固醇、10%猪油、20%蔗糖、67%大鼠维持饲料)连续喂养4周。造模组大鼠在禁食但不禁饮用水20h之后,使用1%STZ(在冰浴条件下使用现配的0.1mmol·L⁻¹柠檬酸钠缓冲液进行溶解),按照30mg·kg⁻¹的剂量对造模组大鼠进行第1次腹腔注射,7d后以25mg·kg⁻¹剂量进行第2次STZ腹腔注射,之后继续予以高脂饲料喂养^[4]。Control组大鼠于同时段腹腔注射等剂量的柠檬酸钠缓冲液(pH=4.5)。所有大鼠在首次注射STZ后的第3、6、9、12、15天的同一时间段,采用尾尖取血法检测随机血糖。通过观察,大鼠出现精神萎靡,反应迟钝,动作迟缓,弓背蜷体,毛竖无光泽,体质量减轻,饮水量、进食量、尿量显著增加等症状;伴随随机血糖 ≥ 16.7 mmol·L⁻¹且血糖维持10d以上,判定为T2DM造模成功^[5-6]。在干预过程中,5只大鼠疑因血糖过高、灌胃不当死亡。根据随机数字表法,将大鼠分为模型(DM)组、左归降糖通脉方低剂量(ZJTF.L)组、左归降糖通脉方高剂量(ZJTF.H)组、二甲双胍+阿托伐他汀(M.A)组,每组各10只。

2.2 给药方法

按人与大鼠体表面积换算法计算大鼠给药剂量,根据公式 $D_2=D_1 \times R_2/R_1$ (D_2 为所求剂量, D_1 为药物已知剂量, R_1 为成人体表面积换算比值, R_2 为大鼠体表面积换算比值,以60kg成人每日服用药物剂量与320g大鼠体表面积换算比值计算大鼠每日给药量。即 $R_1=346.68$, $R_2=9.63$,其中 $D_1=144$ g),得出 D_2 为4g。ZJTF.L组以临床等效剂量灌胃,约为12g·kg⁻¹、ZJTF.H组灌胃量约为24g·kg⁻¹(2倍临床等效剂量)^[7]。M.A组灌胃量为二甲双胍150mg·kg⁻¹+阿托伐他汀10mg·kg⁻¹。Control组、DM组予以等体积的生理盐水。各组连续灌胃4周。

2.3 大鼠状态、体质量、随机血糖检测

每日观察大鼠精神状态、毛发颜色、运动状态、饮水量、进食量、尿量、大便情况等;称取大鼠体质

量;采集大鼠尾尖处血液,用血糖测试仪检测大鼠随机血糖。

2.4 糖化血红蛋白、胰岛素、血脂、炎症因子检测

以1%戊巴比妥钠腹腔麻醉大鼠,进行腹主动脉取血。在室温静置2 h后,3 000 r·min⁻¹离心15 min(离心半径17.8 cm),分层后取上层血清样本,冷冻后送至湖南中医药大学第一附属医院检验科生化室,检测总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)水平升高,高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)水平。ELISA法测定INS、HbA1c、IL-1 β 、IL-6及TNF- α 水平,具体操作步骤按试剂盒说明书进行。

2.5 结肠 HE 染色

腹腔麻醉后,打开大鼠腹腔,剥离、剪取一段近端结肠,在预冷的生理盐水中去除肠内容物。放入4%多聚甲醛固定液中固定24 h,脱水、石蜡包埋、切片、脱蜡、染色、光学显微镜下观察结肠形态。

2.6 16SrRNA 测序观察大鼠肠道菌群的变化

各组随机抽取6只大鼠,予灭菌剪刀剪开结肠,用无菌镊取出肠道内粪便,转移至无菌冻存管,液氮速冻15 min后于-80℃冰箱冻存。干冰储存送至北京诺禾致源科技股份有限公司检测。提取基因组DNA和扩增PCR,混样和纯化PCR产物,构建文库,上机测序,分析相关信息。

2.7 GC-MS 检测 SCFA 含量

无菌采血后,收集大鼠腹主动脉血,室温静置1 h凝固分层,3 000 r·min⁻¹,4℃离心5 min(离心半径17.8 cm),取上清转至干净离心管中。再12 000 r·min⁻¹4℃离心10 min(离心半径10 cm),取上清分装到2 mL无菌冻存管。液氮速冻15 min,-80℃冰箱冻存。干冰储存送至北京诺禾致源科技股份有限公司检测。配制7种主要SCFA标准品,提取代谢物,分析GC-MS图谱,绘制标准曲线,计算SCFA水平。

2.8 统计学分析

采用SPSS 25.0统计软件进行分析。数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。符合正态分布且方差齐,使用单因素方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验;方差不齐则用非参数检验。*P*<0.05表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 左归降糖通脉方对 T2DM 大鼠精神状态、体质量的影响

与Control组相比,DM组大鼠精神较差,反应及动作均迟缓,毛发脏黄、成簇,饮水量、进食量、尿量增加。与DM组比较,各药物干预组大鼠精神较好,反应及动作相对灵活,饮水量、进食量及尿量相对减少。

与Control组比较,DM组在造模后、治疗后体质量下降(*P*<0.05,*P*<0.01);与DM组比较,各药物干预组在治疗后的体质量均升高(*P*<0.05,*P*<0.01);与ZJTF.L组比较,ZJTF.H组、M.A组大鼠在治疗后的体质量明显升高(*P*<0.01)。详见表1。

表1 左归降糖通脉方对 T2DM 大鼠体质量的影响
($\bar{x}\pm s, n=10, g$)

组别	造模后	治疗后
Control组	408.6 \pm 14.2	472.3 \pm 13.5
DM组	372.2 \pm 16.8*	320.8 \pm 10.0**
ZJTF.L组	370.3 \pm 12.6	348.3 \pm 15.4 [#]
ZJTF.H组	371.1 \pm 20.3	360.6 \pm 14.1 ^{##} $\Delta\Delta$
M.A组	370.9 \pm 18.6	367.1 \pm 16.6 ^{##} $\Delta\Delta$

注:与Control组比较,**P*<0.05,***P*<0.01;与DM组比较,[#]*P*<0.05,^{##}*P*<0.01;与ZJTF.L组比较, $\Delta\Delta$ *P*<0.01。

3.2 左归降糖通脉方对 T2DM 大鼠血糖、糖化血红蛋白、胰岛素的影响

与Control组比较,DM组的血糖、HbA1c、INS明显增加(*P*<0.01);与DM组比较,各药物干预组血糖、HbA1c、INS均明显降低(*P*<0.05,*P*<0.01);与ZJTF.L组比较,ZJTF.H组和M.A组血糖、HbA1c、INS明显降低(*P*<0.01)。详见表2。

表2 左归降糖通脉方对 T2DM 大鼠血糖、糖化血红蛋白、胰岛素的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	造模后血糖/(mmol·L ⁻¹)	治疗后血糖/(mmol·L ⁻¹)	HbA1c/(ng·mL ⁻¹)	INS/(mIU·L ⁻¹)
Control组	5.8 \pm 0.8	6.6 \pm 0.4	148.31 \pm 5.75	12.77 \pm 1.19
DM组	26.2 \pm 3.2**	27.4 \pm 2.6**	325.53 \pm 8.43**	36.60 \pm 4.59**
ZJTF.L组	26.5 \pm 2.9	20.3 \pm 2.4 [#]	253.07 \pm 4.78 ^{##}	27.10 \pm 2.07 ^{##}
ZJTF.H组	26.6 \pm 2.6	15.1 \pm 2.1 ^{##} $\Delta\Delta$	188.36 \pm 2.88 ^{##} $\Delta\Delta$	19.28 \pm 5.05 ^{##} $\Delta\Delta$
M.A组	26.8 \pm 3.1	13.9 \pm 3.2 ^{##} $\Delta\Delta$	172.68 \pm 2.89 ^{##} $\Delta\Delta$	17.40 \pm 3.60 ^{##} $\Delta\Delta$

注:与Control组比较,***P*<0.01;与DM组比较,[#]*P*<0.05,^{##}*P*<0.01;与ZJTF.L组比较, $\Delta\Delta$ *P*<0.01。

3.3 左归降糖通脉方对 T2DM 大鼠血脂的影响

与 Control 组比较,DM 组大鼠的 TC、TG、LDL-C 水平明显升高($P<0.01$),HDL-C 明显降低($P<0.01$);与 DM 组比较,药物干预各组的 TC、TG、LDL-C 明显降低($P<0.01$),HDL-C 明显升高($P<0.01$);与 ZJTF.L 组比较,M.A 组、ZJTF.H 组 TC、TG、LDL-C 明显降低($P<0.01$),HDL-C 明显升高($P<0.01$)。详见表 3。

表 3 左归降糖通脉方对 T2DM 大鼠血脂的影响
($\bar{x}\pm s, n=6, \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)

组别	TC	TG	HDL-C	LDL-C
Control 组	1.98±0.07	0.65±0.03	1.78±0.04	0.62±0.06
DM 组	6.12±0.14**	2.34±0.23**	0.62±0.06**	1.96±0.08**
ZJTF.L 组	3.65±0.10 [#]	1.62±0.08 [#]	0.99±0.05 [#]	1.70±0.08 [#]
ZJTF.H 组	2.76±0.06 ^{#△△}	1.08±0.06 ^{#△△}	1.51±0.03 ^{#△△}	1.37±0.06 ^{#△△}
M.A 组	2.35±0.13 ^{#△△}	0.93±0.06 ^{#△△}	1.58±0.06 ^{#△△}	1.26±0.09 ^{#△△}

注:与 Control 组比较,** $P<0.01$;与 DM 组比较,[#] $P<0.01$;与 ZJTF.L 组比较,^{△△} $P<0.01$ 。

3.4 左归降糖通脉方对 T2DM 大鼠血清炎症因子的影响

与 Control 组比较,DM 组 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的水平明显升高($P<0.01$)。治疗后,药物干预各组的炎症因子水平较 DM 组明显降低($P<0.01$),与 ZJTF.L 组比较,ZJTF.H 组和 M.A 组的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平明显降低($P<0.05, P<0.01$)。详见表 4。

表 4 左归降糖通脉方对 T2DM 大鼠血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平的影响($\bar{x}\pm s, n=6, \text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)

组别	IL-1 β	IL-6	TNF- α
Control 组	18.24±1.52	84.50±4.65	95.29±24.90
DM 组	62.70±6.93**	115.51±7.76**	244.54±17.41**
ZJTF.L 组	46.61±4.35 [#]	96.68±8.40 [#]	176.71±33.40 [#]
ZJTF.H 组	35.71±3.35 ^{#△}	88.59±10.56 ^{#△}	144.69±22.97 ^{#△△}
M.A 组	36.54±2.74 ^{#△}	85.70±8.50 ^{#△}	124.70±33.44 ^{#△△}

注:与 Control 组比较,** $P<0.01$;与 DM 组比较,[#] $P<0.01$;与 ZJTF.L 组比较,[△] $P<0.05, \Delta P<0.01$ 。

3.5 左归降糖通脉方对 T2DM 大鼠肠上皮黏膜屏障的影响

HE 染色可见,Control 组的结肠结构清晰、肠上皮黏膜完整,颜色鲜艳;细胞连接紧密,皱襞、肠绒毛等清晰可见,未见明显损伤。DM 组结构模糊,固有层出现部分中断和消失,大量肠腺上皮细胞变性,可见充血、水肿,肠绒毛紊乱和碎裂。与 DM 组比较,药物干预组的肠腺上皮细胞变性、水肿及炎性细胞浸润均有不同程度缓解,肠绒毛呈有序排列,其中 ZJTF.H 组和 M.A 组的结构较为完整。详见图 1。

3.6 左归降糖通脉方对 T2DM 大鼠肠道菌群的影响

3.6.1 Alpha 与 Beta 多样性分析 Observed species 表示直接检测到的物种数量,Chao1 可估计群落样品中包含的物种总数,Shannon 指样品中的分类总数及其占比。一般群落多样性越高,物种分布越均匀,Shannon 指数越大,以此来综合评价肠道微生物群的丰度与多样性。如图 2 所示,与 Control 组比较,DM 组 Observed species、Chao1 和 Shannon 指数明显降低;与 DM 组比较,ZJTF.L、ZJTF.H 组和 M.A 组的 Observed species、Chao1 和 Shannon 指数明显升高。

基于 OTU 水平的 PCA 分析结果见图 3,样本的群落组成越相似,则它们在 PCA 图中的距离越接近。与 Control 组相比,造模各组的菌群组成较为相似。根据聚类得到 OTUs 结果,分析不同组之间共有、特有的 OTU,圈和圈重叠部分的数字表示组与组之间共有的 OTU 个数,没有重叠部分的数字代表各组的特有 OTUs 个数。干预后,ZJTF.H 组和 M.A 组菌群的多样性较 DM 组更为丰富。

3.6.2 菌群物种组成分析 根据物种注释结果,选取各组在门、科、属水平上最大丰度排名前 10 的物种,生成物种相对丰度柱形累加图(图 4)。在门水平上,与 Control 组比较,DM 组厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)的相对丰度增加,拟杆菌

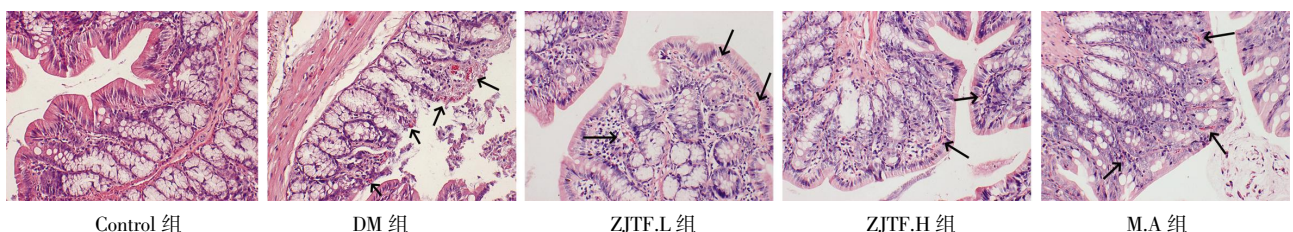


图 1 各组结肠组织病理变化(HE, $\times 200$)

注:黑色箭头为肠上皮细胞充血。

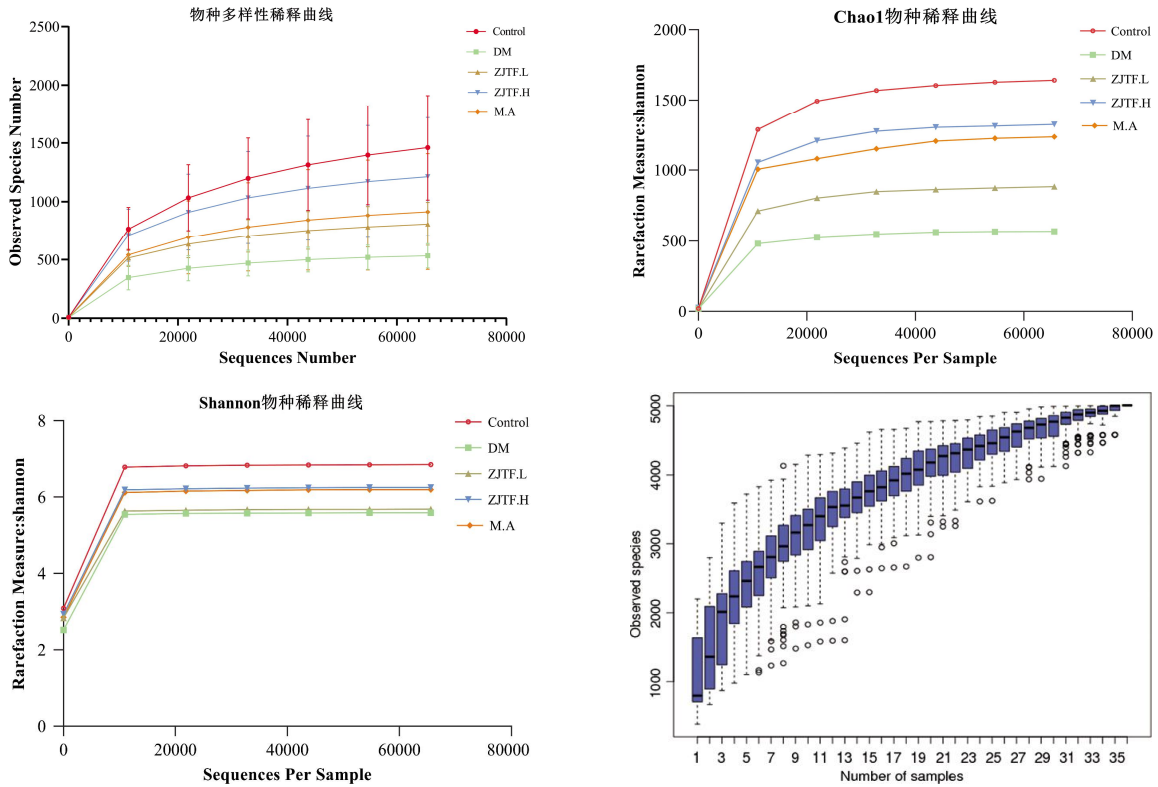


图 2 左归降糖通脉方对 T2DM 大鼠肠道菌群 Alpha 多样性的影响

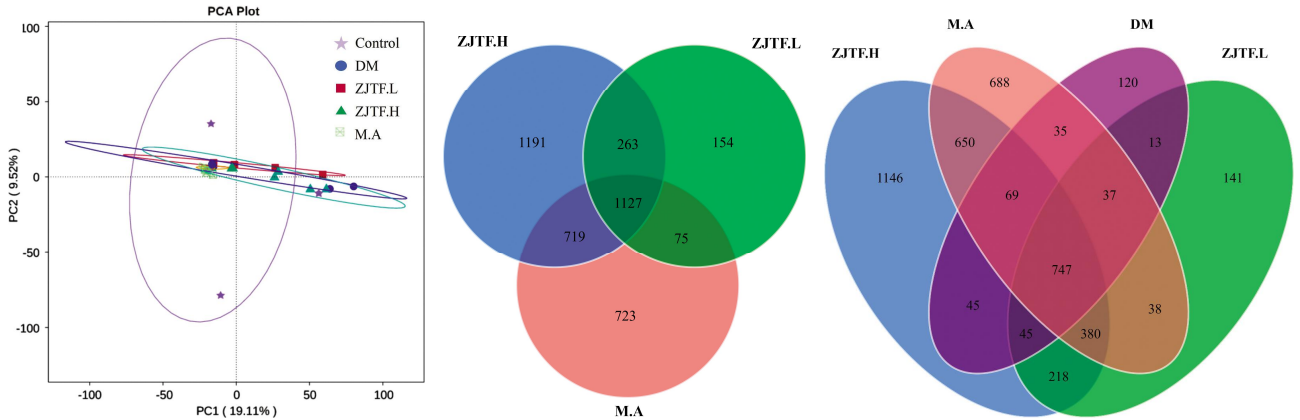


图 3 左归降糖通脉方对 T2DM 大鼠肠道菌群 Beta 多样性的影响

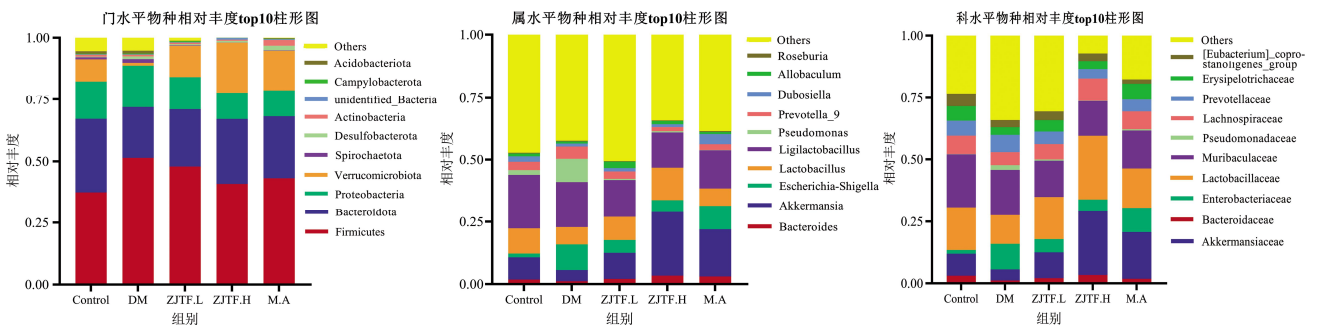


图 4 左归降糖通脉方对 T2DM 大鼠肠道微生物群门、科、属水平的影响

门(Bacteroidota)和疣微菌门(Verrucomicrobiota)显著减少;ZJTF.H组和M.A组干预后则逆转了上述菌群门水平的相对丰度。在科水平上,DM组减少了拟

杆菌科(Bacteroidaceae)、阿克曼菌科(Akkermansiaceae)、乳酸菌科(Lactobacillaceae)相对丰度,增加了肠杆菌科(Enterobacteriaceae)丰度,ZJTF的干预

逆转了其丰度。同样,在属水平上,发现一些细菌的丰度在 ZJTF 干预后发生了显著变化;ZJTF 显著增加了阿克曼菌属(*Akkermansia*)丰度,减少了埃希菌-志贺菌属(*Escherichi-Shigella*)的丰度。

3.6.3 相关性分析 使用 Spearman 对 ZJTF 治疗 T2DM 大鼠后的血清生化指标、脂质代谢、炎症因子关键基因与肠道菌群种类的相关性进行分析,发现门水平的 Firmicutes 与 RBG、TC、TG 和 IL-1 β 呈正相关,与 HDL-C 呈负相关;Bacteroidota 与 HDL-C 呈正相关;Verrucomicrobiota 与 TC 呈负相关。科水平的 Enterobacteriaceae 与 LDL-C 和 IL-6 呈正相关,与 HDL-C 呈负相关;Pseudomonadaceae 与 TC 呈正相关,与 HDL-C 呈负相关。属水平的 *Escherichi-Shigella* 与 LDL-C 和 IL-6 呈正相关,与 HDL-C 呈负相关;Prevotella 与 TC 呈正相关,与 HDL-C 呈负相关。详见图 5。

3.7 左归降糖通脉方对 T2DM 大鼠血清 SCFA 含量的影响

标准品 TIC 图可明确能否使用 GC-MS 对各代谢物进行质谱定量分析,图 6 可见各类代谢物峰形尖锐对称,表明色谱分离较好。QC-RSD 值可显示整个检测过程的稳定性,各类 SCFA 的 RSD 值<30%,说明此次实验数据稳定可靠。

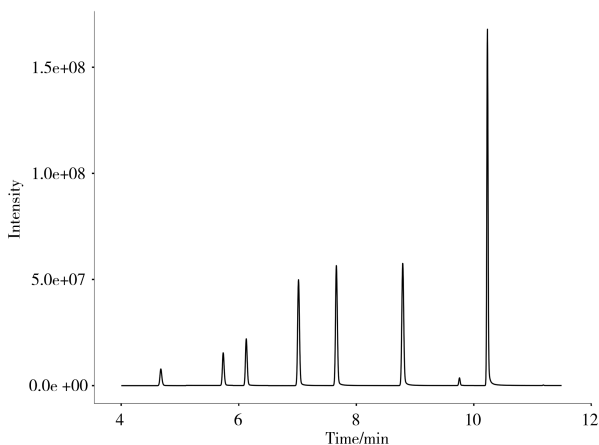


图 6 SCFA 标准品 TIC 图及 QC-RSD 值

表 5 各组大鼠血清 SCFA 含量($\bar{x}\pm s, n=6, \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

组别	乙酸	丙酸	异丁酸	丁酸	异戊酸	己酸
空白组	50.96 \pm 6.04	0.34 \pm 0.08	0.11 \pm 0.10	0.18 \pm 0.07	0.02 \pm 0.01	0.05 \pm 0.03
DM 组	43.33 \pm 3.60**	0.30 \pm 0.04	0.05 \pm 0.02	0.11 \pm 0.06*	0.10 \pm 0.15	0.03 \pm 0.02
ZJTF.L 组	67.79 \pm 8.95 [#]	0.39 \pm 0.13	0.06 \pm 0.03	0.22 \pm 0.04	0.01 \pm 0.01	0.04 \pm 0.03
ZJTF.H 组	82.41 \pm 18.42 ^{#Δ}	0.48 \pm 0.13	0.09 \pm 0.10	0.28 \pm 0.04 [#]	0.03 \pm 0.02	0.05 \pm 0.01
M.A 组	70.43 \pm 14.31 [#]	0.46 \pm 0.19	0.06 \pm 0.12	0.26 \pm 0.19	0.02 \pm 0.02	0.01 \pm 0.01

注:与 Control 组比较,* P <0.05,** P <0.01;与 DM 组比较,[#] P <0.05,[#] P <0.01;与 ZJTF.L 组比较, Δ P <0.05, $\Delta\Delta$ P <0.01。

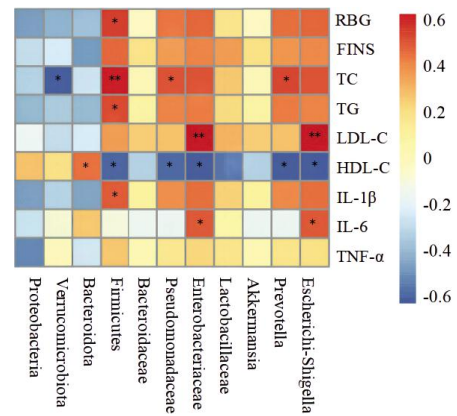
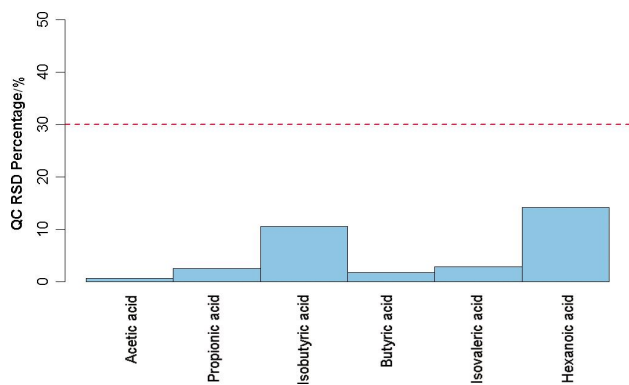


图 5 左归降糖通脉方治疗 T2DM 大鼠后差异菌群与代谢指标的相关性分析热图

与 Control 组相比,DM 组大鼠血清乙酸、丁酸含量明显下降(P <0.05, P <0.01);与 DM 组比较,ZJTF.L 组和 M.A 组的乙酸明显升高(P <0.01)、ZJTF.H 组的丁酸、乙酸含量明显升高(P <0.05, P <0.01),与 ZJTF.L 组比较,ZJTF.H 组的乙酸含量明显升高(P <0.05)。由于部分样本未检测到戊酸的含量,故不予统计。详见表 5。

4 讨论

肠道被称为人体最大的“免疫器官”,可免疫诱导食物和菌群中的刺激分子和病原微生物。定植在人体肠道的菌群有 1 000 多种,绝大部分为厌氧



菌,以拟杆菌门、厚壁菌门、放线菌门、变形菌门和疣微菌门这五个门水平为主,其中,拟杆菌门和厚壁菌门占比 90%^[18]。机体摄入的食物会在肠道菌群的降解代谢作用下产生各类代谢产物,它们可以与宿主相互作用,影响宿主的代谢稳态^[19]。常见的作用有将难以消化的膳食纤维分解为 SCFA、处理食物中的多糖、影响能量代谢、参与氨基酸及神经递质的合成等^[20]。肠道菌群稳态与 T2DM 密切相关。当肠道菌群出现紊乱,外来致病菌和体内的其他细胞组分会作为抗原刺激宿主免疫系统,诱导病原体-宿主稳态失衡,同时干扰机体进行物质代谢与交换^[21]。另一方面,机体糖脂代谢紊乱和脂质沉积,会导致肠道菌群相关有害代谢产物累积,通过生物合成途径对肠道通透性及机体免疫炎症产生影响,引起肠内外靶器官炎症因子的释放,影响 T2DM 的发生发展^[22]。

研究发现,T2DM 患者肠道菌群的组成、丰度,与健康者相比有明显变化,主要表现为中度微生物菌群失调^[23]。一项基于宏基因组测序的研究发现^[24]糖尿病(diabetes mellitus, DM)患者乳杆菌属的增加与其体内的血糖、HbA1C 呈正相关,梭菌属的减少与血糖、HbA1C、胰岛素、TG 呈负相关。另外,双歧杆菌、拟杆菌属、阿克曼菌属和罗氏伯菌属与 T2DM 呈负相关,而梭杆菌属和布鲁菌属与 T2DM 呈正相关^[25]。动物实验方面,有研究者将健康大鼠与 DM 大鼠粪便菌群进行 16S rRNA 测序,发现 DM 模型大鼠的粪便菌种结构中,肠球菌、肠杆菌等机会致病菌数量增加^[26]。这些结果也说明肠道菌群参与了 T2DM 的发生与发展。本研究通过对 T2DM 大鼠的粪便进行 16S rRNA 测序发现,与 DM 组比较,ZJTF.H 组的 Observed species、Chao1 和 Shannon 指数上升。分析菌群结构和丰度后,发现在门、科、属水平上,ZJTF.H 组的有益菌,如拟杆菌门和疣微菌门、阿克曼菌科和乳酸菌科、阿克曼菌属显著增加,厚壁菌门和变形菌门、肠杆菌科等条件致病菌的相对丰度减少。在对 ZJTF 治疗 T2DM 大鼠后的血清生化指标、脂质代谢、炎症因子关键基因与肠道菌群种类的相关性进行分析后发现,条件致病菌群与 RBG、TC、TG、IL-1 β 和 IL-6 呈正相关,与 HDL-C 呈负相关,有益菌群与 TC 呈负相关。这些结果表明,ZJTF 的干预在一定程度上改善了 T2DM 模型大鼠的菌群结构、丰度及多样性,且可以通过作用于某些特定菌群影响糖脂代谢

与炎症反应。

SCFA 作为肠道菌群最主要的代谢产物之一,多是由未消化吸收的食物残渣中的碳水化合物,经结肠内厌氧菌酵解产生^[27]。结肠内的总 SCFA 浓度从近端到远端逐渐降低,主要包括乙酸、丙酸和丁酸,占比为 60:25:15^[28]。大部分肠道微生物及其宿主肠上皮细胞所需的能量均来自 SCFA,它可以降低人体结肠的内环境酸碱度,还可以促进细胞体积增加,减少条件致病菌生长^[29]。在疾病预防方面^[30],SCFA 可以通过提高人体胰岛素敏感性,维持正常的糖代谢平衡,从而有效减少肥胖、DM、心血管疾病等代谢性疾病的发生^[30]。目前,研究较多的 SCFA 主要为乙酸、丙酸、丁酸,肠道内细菌发酵产生的 SCFA 减少,丙酸介导的 G 蛋白偶联受体 41 表达上调,导致酪酪肽或胰高血糖素样肽-1 分泌减少,引起食欲增加或血糖升高,而乙酸介导的 G 蛋白偶联受体 43 (G protein-coupled receptor 43, GPR43) 缺陷,可阻碍糖酵解,引发胰岛素抵抗状态^[31-32]。SCFA 还可以通过激活 GPR43 等下游相关的信号通路来调控机体免疫炎症反应,阻止外来的病原菌进入机体^[33-34]。本研究通过 GC-MS 检测 T2DM 大鼠血清中几种主要的 SCFA 水平,发现与 DM 组比较,ZJTF.H 组的丁酸、乙酸升高。这表明 ZJTF 可以增加体内 SCFA 含量,且这种调节是有益的。

综上所述,ZJTF 可以通过调控 T2DM 大鼠肠道菌群结构、丰度及多样性,增加肠道代谢产物 SCFA 含量,减轻肠上皮黏膜屏障损伤,改善糖脂代谢与炎症反应,从而达到防治 T2DM 的目的。ZJTF 以肠道菌群及其代谢产物 SCFA 为靶点的“肠道菌群-代谢”途径,可能为 T2DM 的预防和治疗提供新思路。

参考文献

- [1] 王仁和,石岩,张洋,李东垣从“脾胃”论消渴病机理研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2018, 24(4): 434-435.
- [2] 任静,李会敏,李宇思,等. 基于肠道菌群探讨从脾胃论治 2 型糖尿病[J]. 世界中西医结合杂志, 2023, 18(1): 183-186, 190.
- [3] 郭文茜,王琦,郭刚,等. 基于人体肠道菌群探讨“脾为后天之本”[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(9): 5165-5168.
- [4] 吴深涛,王斌,章清华,等. 论糖尿病从“脾不散精”到“浊毒内蕴”之病机观[J]. 中医杂志, 2018, 59(22): 1920-1924.
- [5] HALMOS T, SUBA I. Physiological patterns of intestinal microbiota. The role of dysbacteriosis in obesity, insulin resistance, diabetes and metabolic syndrome[J]. Orvosi Hetilap, 2016, 157

- (1): 13–22.
- [6] ZHAO L, LOU H, PENG Y, et al. Elevated levels of circulating short-chain fatty acids and bile acids in type 2 diabetes are linked to gut barrier disruption and disordered gut microbiota[J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2020, 169: 108418.
- [7] 邓奕辉, 崔莲珠, 喻 嵘, 等. 降糖通脉方治疗糖尿病合并脑梗死 32 例临床观察[J]. *湖南中医学院学报*, 2004(5): 40–42.
- [8] 邓奕辉. 滋阴益气活血法抗糖尿病合并脑梗塞的临床与实验研究[D]. 长沙: 湖南中医学院, 2001.
- [9] 李钰佳, 李定祥, 张 熙, 等. 基于 AGEs/RAGE/NF- κ B 通路探讨左归降糖通脉方对大鼠脑微血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. *湖南中医药大学学报*, 2022, 42(7): 1057–1063.
- [10] 邓奕辉, 李定祥, 喻 嵘, 等. 滋阴活血解毒中药对血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. *中国中医药信息杂志*, 2008(6): 27–29.
- [11] 蔡昱哲, 邓奕辉, 李定祥, 等. 基于“态靶理论-调节肠道菌群”探讨中医药防治 2 型糖尿病的新策略[J]. *中医药学报*, 2023, 51(2): 1–5.
- [12] 阳晶晶, 蔡昱哲, 刘艺璇, 等. 近二十年中医药领域肠道菌群研究的 CiteSpace 知识图谱分析[J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(5): 1370–1380.
- [13] MAZHAR M, ZHU Y, QIN L K. The interplay of dietary fibers and intestinal microbiota affects type 2 diabetes by generating short-chain fatty acids[J]. *Foods*, 2023, 12(5): 1023.
- [14] ZHANG M, LV X Y, LI J, et al. The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model[J]. *Experimental Diabetes Research*, 2008, 2008: 704045.
- [15] 韩 旭, 王 璇, 余 芝, 等. STZ 制备糖尿病大鼠模型影响因素的研究进展[J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(5): 716–725.
- [16] 黎 娅, 范培云, 马晓雨, 等. 长期稳定的 SD 大鼠 2 型糖尿病模型制备方法[J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(3): 364–369.
- [17] 贺石林. *中医科研设计与统计学*[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2001: 64.
- [18] ALMEIDA A, NAYFACH S, BOLAND M, et al. A unified catalog of 204, 938 reference genomes from the human gut microbiome[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(1): 105–114.
- [19] 殷 琳, 夏文睿, 黄国鑫, 等. 中药-肠道菌群互作与宿主自身代谢免疫稳态相关性的研究进展[J]. *中草药*, 2022, 53(8): 2526–2538.
- [20] KUMAR J, RANI K, DATT C. Molecular link between dietary fibre, gut microbiota and health[J]. *Molecular Biology Reports*, 2020, 47(8): 6229–6237.
- [21] 贺 云, 杨丽霞, 邱连利. 从肠道微生态角度探讨 2 型糖尿病的发病机制以及治疗措施[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(15): 229–234.
- [22] MUSSO G, GAMBINO R, CASSADER M. Interactions between gut microbiota and host metabolism predisposing to obesity and diabetes[J]. *Annual Review of Medicine*, 2011, 62: 361–380.
- [23] SEDIGHI M, RAZAVI S, NAVAB-MOGHADAM F, et al. Comparison of gut microbiota in adult patients with type 2 diabetes and healthy individuals[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 111: 362–369.
- [24] KARLSSON F H, TREMAROLI V, NOOKAEW I, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control[J]. *Nature*, 2013, 498(7452): 99–103.
- [25] GURUNG M, LI Z P, YOU H, et al. Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology[J]. *EBioMedicine*, 2020, 51: 102590.
- [26] 张 芹, 周中凯, 任晓冲, 等. 高通量测序技术研究糖尿病大鼠与正常大鼠粪便菌群的结构差异[J]. *中国食品学报*, 2017, 17(6): 232–239.
- [27] SALAMONE D, RIVELLESE A A, VETRANI C. The relationship between gut microbiota, short-chain fatty acids and type 2 diabetes mellitus: The possible role of dietary fibre[J]. *Acta Diabetologica*, 2021, 58(9): 1131–1138.
- [28] MORRISON D J, PRESTON T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism[J]. *Gut Microbes*, 2016, 7(3): 189–200.
- [29] 曾 霖, 张鹏翔, 黄 倩, 等. 基于短链脂肪酸防治代谢性疾病的研究进展[J]. *中国全科医学*, 2022, 25(9): 1141–1147.
- [30] SIVAPRAKASAM S, PRASAD P D, SINGH N. Benefits of short-chain fatty acids and their receptors in inflammation and carcinogenesis[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2016, 164: 144–151.
- [31] TOLHURST G, HEFFRON H, LAM Y S, et al. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2[J]. *Diabetes*, 2012, 61(2): 364–371.
- [32] LU Y Y, FAN C N, LI P, et al. Short chain fatty acids prevent high-fat-diet-induced obesity in mice by regulating G protein-coupled receptors and gut microbiota[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 37589.
- [33] HUANG W, MAN Y, GAO C L, et al. Short-chain fatty acids ameliorate diabetic nephropathy via GPR43-mediated inhibition of oxidative stress and NF- κ B signaling[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 2020: 4074832.
- [34] LUO Q J, SUN M X, GUO Y W, et al. Sodium butyrate protects against lipopolysaccharide-induced liver injury partially via the GPR43/ β -arrestin-2/NF- κ B network[J]. *Gastroenterology Report*, 2021, 9(2): 154–165.