

· 药效与毒理学研究 ·

葛根芩连汤干预胰岛素抵抗大鼠的粪便代谢组及相关菌群研究

彭程程¹, 姚亮亮¹, 曾国威¹, 曾治君^{1,2,3}, 盛译萱⁴, 李冰涛^{1,2,3}, 张启云^{1,2,3}, 姜丽^{1,2,3}, 刘海云¹, 徐国良^{1,2,3}(1. 江西中医药大学中医基础理论分化发展研究中心, 江西 南昌 330004; 2. 江西省中医病因生物学重点实验室, 江西 南昌 330004; 3. 江西省中药药理重点实验室, 江西 南昌 330004; 4. 广州市第一人民医院, 广东 广州 510180)

摘要: **目的** 从代谢组学及肠道菌群角度探讨葛根芩连汤干预胰岛素抵抗(IR)大鼠肠道代谢紊乱的作用机制。**方法** 将雄性SD大鼠随机分成正常组、模型组及葛根芩连汤低、中、高剂量(1.65、4.96、14.86 g·kg⁻¹)组。采用高脂饲料喂养12周建立IR大鼠模型;模型复制成功后,连续灌胃给药16周,每天1次,同时继续以高脂饲料喂养。给药结束后,采用超高效液相色谱-串联四级杆-飞行时间质谱(UHPLC/Q-TOF-MS)结合多元分析的代谢组学技术对大鼠的粪便样品进行代谢轮廓分析,分析各组大鼠粪便内源性代谢物的变化,鉴定潜在的生物标记物并进行生物学意义分析。对粪便样品进行16S rRNA V3~V4区域测序,通过两部分模型(Two-part model)对生物标记物与肠道菌群进行关联性分析。**结果** 筛选和鉴定出5个潜在生物标记物:咪唑丙酸、吲哚丙烯酸、二十碳四烯酸、二十四碳六烯酸及十二烷二酸;与模型组比较,葛根芩连汤低剂量组的十二烷二酸含量明显增加($P < 0.05$),二十四碳六烯酸含量明显减少($P < 0.05$)。肠道菌群关联分析结果显示,二十碳四烯酸和十二烷二酸共关联到5个肠道菌群操作分类单元(OTU),涉及到的肠道菌群为厚壁菌门和拟杆菌门,其中厚壁菌门消化链球菌科 *Romboutsia* 属为二者所共有,其余OTU为十二烷二酸特有;另外3个生物标记物未关联到相关肠道菌群。**结论** 葛根芩连汤对高脂诱导的IR大鼠的预防作用可能与其改善肠道中内源性代谢物及相关肠道菌群的水平,恢复体内正常代谢活动有关。

关键词: 胰岛素抵抗; 葛根芩连汤; 代谢组学; 机制; 肠道菌群; 大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)12-1737-08

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.12.001

Study on Fecal Metabolic Mechanism and Related Flora of *Gegen Qin Lian* Decoction in Rats with Insulin Resistance

PENG Chengcheng¹, YAO Liangliang¹, ZENG Guowei¹, ZENG Zhijun^{1,2,3}, SHENG Yixuan⁴, LI Bingtao^{1,2,3}, ZHANG Qiyun^{1,2,3}, JIANG Li^{1,2,3}, LIU Haiyun¹, XU Guoliang^{1,2,3}(1. Research Center for Differentiation and Development of Traditional Chinese Medicine (TCM) Basic Theory, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004 Jiangxi, China; 2. Jiangxi Key Laboratory of TCM Etiopathogenesis, Nanchang 330004 Jiangxi, China; 3. Jiangxi Key Laboratory of Pharmacology of TCM, Nanchang 330004 Jiangxi, China; 4. Guangzhou First People's Hospital, Guangzhou 510180 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism of *Gegen Qin Lian* decoction on intestinal metabolic disorder in insulin resistance (IR) rats from the perspectives of metabolomics and intestinal microflora. **Methods** Male SD rats were randomly divided into normal control group, model group and low, medium and high dose groups of *Gegen Qin*

收稿日期: 2020-08-31

作者简介: 彭程程, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药药理学。Email: 953593444@qq.com。通信作者: 徐国良, 男, 博士, 教授, 研究方向: 中药药理学。Email: xuguoliang6606@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81560744, 81760787); 江西省自然科学基金项目(20192BAB205094); 中药学一流学科建设科研启动基金项目(JXSYLXK-ZHYA0117); 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ190643)。

Lian decoction (1.65, 4.96, 14.86 g·kg⁻¹). IR model was established by feeding high fat for 12 weeks. After the model was successfully replicated, drugs were administered intragastrically once a day for 16 consecutive weeks, while the high fat diet was continued. After administration, the fecal profiles of rats were analyzed by UHPLC-Q-TOF-MS, the changes of endogenous metabolites in feces of rats in each group were analyzed to identify potential biomarkers and explore their biological significance. DNA of fecal samples were sequenced at 16S rRNA V3-V4 region, and the Two-part model was used to analyze relationship between biomarkers and intestinal flora. **Results** After screening, 5 potential biomarkers including imidazole propionic acid, indole acrylic acid, eicosatetraenoic acid, docosahexaenoic acid, and dodecanedioic acid, were identified. Compared with IR group, the content of dodecanedioic acid in the low-dose *Gegen Qin Lian* decoction group was significantly increased ($P < 0.05$), and the content of eicosapentaenoic acid was significantly decreased ($P < 0.05$). The association analysis of gut microbiota showed that eicosatetraenoic acid and dodecanedioic acid were associated with five operating taxonomic units (OTU) of gut microbiota belonged to Firmicutes and Bacteroidetes; of which the Peptostreptococcaceae (*Romboutsia*) that belonged to Firmicutes is shared by both and the remaining OTUs were endemic to the dodecanedioic acid. The other 3 biomarkers were not associated with the relevant intestinal microflora. **Conclusion** The preventive effect of *Gegen Qin Lian* decoction on high-fat-induced IR rats may function by improving the levels of endogenous metabolites and regulating related intestinal flora in the intestine, thereby restoring normal metabolic activities *in vivo*.

Keywords: Insulin resistance; *Gegen Qin Lian* decoction; metabonomics; mechanism; gut microbiota; rats

糖尿病是以胰岛素抵抗(IR)、高血糖为主要特征的一种慢性代谢性疾病, 由于IR阶段是发展为2型糖尿病(T2DM)的可逆阶段^[1], 在此阶段进行有效干预可以降低糖尿病的患病率。研究^[2-4]表明, 肠道菌群参与了T2DM的发病过程, IR与肠道菌群的改变密切相关。因此, 探究肠道代谢及相关菌群对预防T2DM的发生发展具有重要意义。葛根芩连汤源自张仲景的《伤寒论》, 由葛根、黄芩、黄连、甘草4味中药组成, 有清热燥湿功效, 主治协热下利。随着对葛根芩连汤药理与临床研究的不断深入, 其被广泛应用于T2DM的临床治疗^[5-6]。研究^[7]发现, 葛根芩连汤的降糖作用可以改变肠道微生物群的结构, 通过增加体内粪便杆菌等有益菌的数量来改善T2DM。

代谢组学已广泛应用于探究中药及其复方对疾病的作用机制^[8]。与血液代谢组比较, 粪便能更有效反映出肠道菌群在肠道内的状态和其对药物、食物等的代谢信息, 粪便代谢组能检测到约68%的肠道代谢物^[9-10], 为更好地探究药物在肠道中的代谢情况提供途径。本课题组前期研究^[11]表明, 葛根芩连汤对高脂饮食诱导的IR大鼠具有降低血糖、血脂的作用, 葛根芩连汤低剂量(1.65 g·kg⁻¹)具有预防T2DM的作用。但其通过调节肠道菌群及肠道代谢来预防IR大鼠向糖尿病发生发展的作用机制尚不明确。因此, 本研究拟采用超高效液相色谱-串联四级杆-飞行时

间质谱(UHPLC/Q-TOF-MS)技术, 继续对正常组、IR组(模型组)及葛根芩连汤低剂量组大鼠粪便中的内源性代谢物进行分析鉴定, 同时分析生物标记物相关联的肠道菌群, 以阐明葛根芩连汤低剂量干预IR大鼠肠道代谢紊乱的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物 4~5周龄雄性SD大鼠48只, SPF级, 体质量(180±200)g, 由江西中医药大学实验动物科技中心提供, 实验动物生产许可证号: SCXK(湘)2018-0003, 动物质量合格证号: 201810085。饲养条件: 室温为(22±2)℃, 相对湿度为40%~60%, 自由摄食、饮水。

1.2 药物及试剂 葛根(批号: 180124)、黄芩(批号: 171215)、黄连(批号: 180131)、炙甘草(批号: 171214), 均购自江西江中中药饮片有限公司, 符合《中华人民共和国药典》标准。高脂饲料(批号: D12492, 由60%脂肪、20%蛋白质和20%糖类组成)、普通饲料(批号: GB14924), 均购自上海帆泊生物技术有限公司。粪便DNA提取试剂盒, 德国Qiagen公司, 批号: 160033067。甲醇(批号: 10910907738)、乙腈(批号: SHBK4873), 均购自德国Merck公司; 甲酸, 美国DikmaPure公司, 批号: 2119758。

葛根芩连汤的制备^[12]:按照葛根:黄芩:黄连:炙甘草的质量比为 8:3:3:2 称取药材,加 8 倍量水浸泡 30 min;加热至沸腾后改用文火煎煮 40 min,趁热用纱布滤过;滤液浓缩至 1.485 g·mL⁻¹(按生药量计算);取部分浓缩液稀释至 0.496、0.165 g·mL⁻¹后,冷却分装,于 4℃冰箱保存,备用。

1.3 主要仪器 1290-G6538 型超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱仪,美国 Agilent 公司;SL8R 型台式高速冷冻离心机,德国 Thermo Fisher 科技公司;罗氏 Modularp800 型生化仪,德国罗氏公司;GENO 2010 型高通量冷冻组织研磨仪,美国 SPEX SamplePrep 公司;Nanodrop-2000 型核酸蛋白测定仪,美国 Thermo Fisher 科技公司;ChemiDocXRS+型化学发光凝胶成像系统,美国 Bio-Rad 公司;HiSeq 2500 型测序平台,美国 Illumina 公司。

1.4 分组、模型复制及给药^[11] 将 48 只雄性大鼠适应性喂养 1 周后,按体质量随机分为正常组(8 只)和高脂造模组(40 只)。正常组给予普通饲料,高脂造模组给予高脂饲料,连续喂养 12 周以复制 IR 模型(成模率 80%)。模型复制成功后,将 IR 模型大鼠随机分为模型组及葛根芩连汤低、中、高剂量组,每组 8 只,并继续给予高脂饲料喂养。葛根芩连汤低、中、高剂量组分别按照 1.65、4.96、14.86 g·kg⁻¹剂量灌胃给药,每天 1 次,给药体积为 10 mL·kg⁻¹,连续给药干预 16 周。正常组、模型组灌胃等量蒸馏水。

造模后(分组前)及给药后,检测大鼠空腹血糖(FPG)及空腹胰岛素(FINS)水平,并计算 IR 指数,结果见前期研究^[11]。分组前与正常组比较,造模组大鼠的 IR 指数明显升高($P<0.05$),空腹血糖值无明显变化($P>0.05$),表明高脂造模大鼠尚未出现空腹血糖异常情况,处于糖尿病前期 IR 阶段,IR 模型复制成功。给药 16 周后,与正常组比较,模型组大鼠的空腹血糖与 IR 指数均明显上升($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较,葛根芩连汤低剂量组大鼠的空腹血糖与 IR 指数均明显下降($P<0.05$, $P<0.01$),葛根芩连汤中剂量组大鼠仅 IR 指数下降($P<0.01$),葛根芩连汤高剂量组大鼠的空腹血糖、IR 指数均无明显变化($P>0.05$)。结果表明,低剂量(1.65 g·kg⁻¹)葛根芩连汤能够在干预 IR 的同时起到预防 T2DM 的作用。因此,基于本研究目的,后续实验选择葛根芩连汤低剂量组进行代谢组学分析。

1.5 粪便样品的收集及预处理^[13] 给药结束后,收集各组大鼠粪便,-80℃保存备用。检测前在 4℃下解

冻粪便样品,称取粪便 80 mg 于 1.5 mL EP 管中;加入超纯水 200 μL,高速震荡 20 s,4℃下以 14 000 r·min⁻¹(离心半径为 8.5 cm)离心 15 min,取上清液于 1.5 mL EP 管中;加入 200 μL 乙腈于沉淀,重复上一步操作后,在沉淀中加入 200 μL 甲醇,收集 3 次上清液置于同一 EP 管内;4℃下以 16 000 r·min⁻¹(离心半径为 8.5 cm)离心 15 min,0.22 μm 有机滤膜过滤,取上清液供 UHPLC/Q-TOF-MS 检测分析。

1.6 粪便 DNA 16S rRNA 测序及质控 参考相关研究^[14]方法,采用粪便 DNA 提取试剂盒提取粪便中的肠道菌群基因组 DNA,利用核酸蛋白测定仪检测肠道菌群基因组 DNA 的浓度和纯度,并用 1%琼脂糖凝胶检测完整性;通过 Illumina HiSeq 2500 型测序平台对 16S rRNA 基因的 V3~V4 区域进行测序,将测序得到的原始 Reads 对序列质量进行质控和过滤,再提取其丰度值进行后续关联分析。

1.7 样品分析 采用 UHPLC/Q-TOF-MS 技术建立粪便代谢组学检测方法。色谱条件:色谱柱为 ZORBAX Extend-C₁₈ 柱(2.1 mm×100 mm, 3.5 μm);流动相为 0.1%甲酸水(A)-0.1%甲酸乙腈(B),正/负离子模式下的梯度洗脱程序见表 1;柱温:35℃,样品室温度:4℃,流速:0.4 mL·min⁻¹,进样量 4 μL。

表 1 正/负离子模式下的梯度洗脱条件

Table 1 Gradient elution conditions under positive/negative ion modes

扫描模式	时间/min	A 相/%	B 相/%
正离子模式	0	98	2
	2	91	9
	5	65	35
	11	46	54
	12	33	67
	25	0	100
	26	98	2
	27	98	2
负离子模式	0	98	2
	2	92	8
	3	80	20
	27	0	100
	28	98	2
	29	98	2

质谱条件:离子源为电喷雾电离源(ESI);采用正、负离子扫描模式测定,毛细管电压(Capillary voltage)分别为 4 000 V、3 500 V;喷雾室压力为 241.3 kPa;碎片电压(Fragmentor)为 120 V;锥孔电

压为 60 V; 干燥气温度为 350 ℃, 流速为 10 L·min⁻¹; 扫描方式为 Full Scan, 扫描范围为 m/z 50~1 200。本实验通过对照组、模型组和葛根芩连汤低剂量组大鼠粪便样品配制成质控(Quality control, QC)样品, 质谱检测分析过程中采用 QC 样品进行检测, 监控 QC 样品的峰保留时间和峰面积, 重复性良好。

1.8 统计学处理方法及代谢组学数据分析 采用 Graphpad prism 6.0 软件进行数据统计分析, 计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示; 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 组间比较采用 t 检验; 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

采用 Profinder(Ver B.06.0)软件对所有采集数据进行非靶向分子特征提取, 得到包含化合物保留时间(RT)、质荷比(m/z)及峰面积(Area)的 .cef 格式文件; 采用 MPP(Mass Profiler Professional)软件对化合物进行主成分分析(PCA), 筛选 Fold change > 2 且 $P < 0.05$ (t 检验)的潜在标记物; 采用 Metlin 数据库对潜在的生物标记物进行匹配, 进一步结合 HMDB 数据库进行分子式及二级质谱数据的碎片信息比对, 最终鉴定各潜在的生物标记物。考察分析各组潜在生物标记物的回调情况, 找出葛根芩连汤干预 IR 大

鼠后具有回调作用的生物标记物, 作为葛根芩连汤干预 IR 作用机制的特异性生物标记物。

1.9 肠道菌群 OTU 与生物标记物的关联分析^[15] 采用两部分模型(Two-part model)相关性分析方法对肠道菌群操作分类单位(OTU)与内源性生物标记物 2 组变量进行关联分析。利用 R 语言中的“Plyr”包获得与生物标记物有关的菌群, 根据 Z 分布计算 Z 得分。若 Z 为正值, 则为正相关, 反之则为负相关。

2 结果

2.1 葛根芩连汤干预 T2DM 前期 IR 大鼠的粪便代谢组学分析

2.1.1 粪便代谢轮廓分析及方法稳定性考察 大鼠粪便 QC 样品在正、负离子模式下的 UHPLC/Q-TOF-MS 总离子流图见图 1。正、负离子模式质控样本的稳定性见表 2、表 3, 在所有质控样本质谱数据中随机选择 6 个峰, 比较保留时间和峰面积, 其相对标准偏差分别为 < 0.32%、< 3.72%。结果表明, 该方法精确性和重现性良好, 检测系统相对稳定, 各组大鼠粪便样品的总离子流图轮廓基本相似, 但峰响应值存在差异。

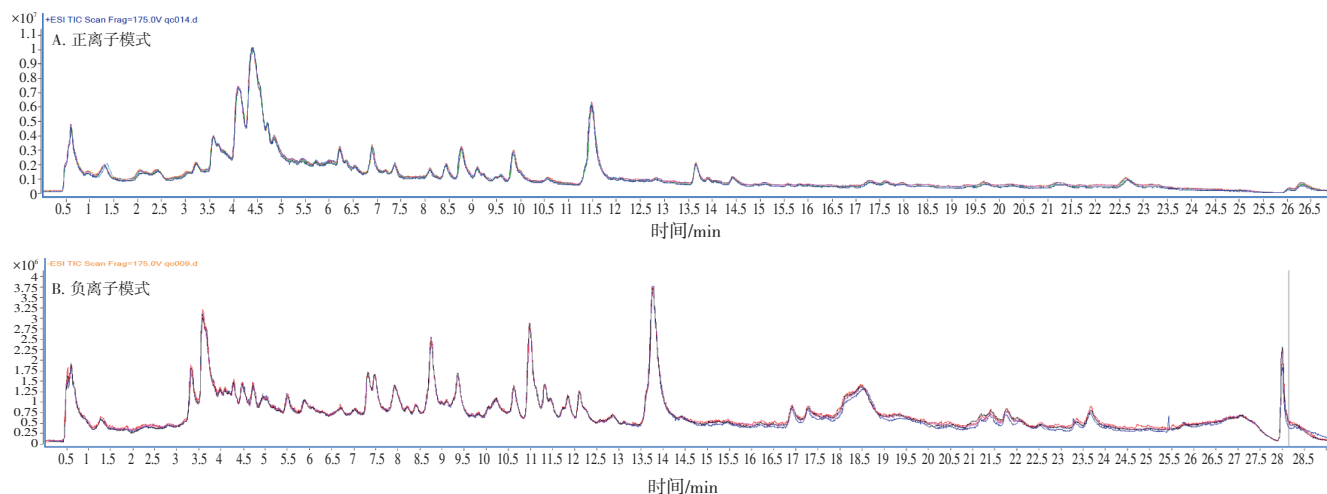


图 1 大鼠粪便的正、负离子模式总离子流图

Figure 1 Total ion chromatograms of rat faeces under positive and negative ion mode

表 2 正离子模式质控样本的稳定性分析

Table 2 Stability of quality control samples under positive ion mode

峰号	m/z 值	保留时间(RT)/min	RSD _{RT} /%	峰面积(Area)	RSD _{Area} /%
1	102.091 5	25.99	0.26	31 536.33	3.71
2	149.059 3	10.45	0.15	24 764.50	2.86
3	243.096 5	6.19	0.09	670 503.83	2.16
4	289.214 8	8.75	0.14	20 967.83	3.60
5	319.161 8	5.19	0.16	74 456.33	2.22
6	357.276 8	14.16	0.05	142 106.00	2.09

表 3 负离子模式质控样本的稳定性分析

Table 3 Stability of quality control samples under negative ion mode

峰号	m/z 值	保留时间(RT)/min	RSD _{RT} /%	峰面积(Area)	RSD _{Area} /%
1	116.035 2	1.13	0.28	27 207.33	2.91
2	135.030 3	0.66	0.31	201 529.33	2.89
3	187.097 4	5.04	0.09	170 674.83	3.08
4	249.149 8	12.89	0.13	206 580.00	2.17
5	271.226 1	21.50	0.14	46 040.17	2.76
6	295.227 6	17.64	0.28	36 276.83	1.25

2.1.2 粪便样本主成分分析 结果见图 2。从各组大鼠粪便样本的主成分分析结果可见，正常组、模型组及葛根芩连汤低剂量组 3 组之间差异明显，组内聚集

情况良好，葛根芩连汤低剂量组有向正常组靠近的趋势。结果表明，葛根芩连汤低剂量有促进 IR 模型大鼠肠道中的小分子代谢物恢复至正常状态的趋势。

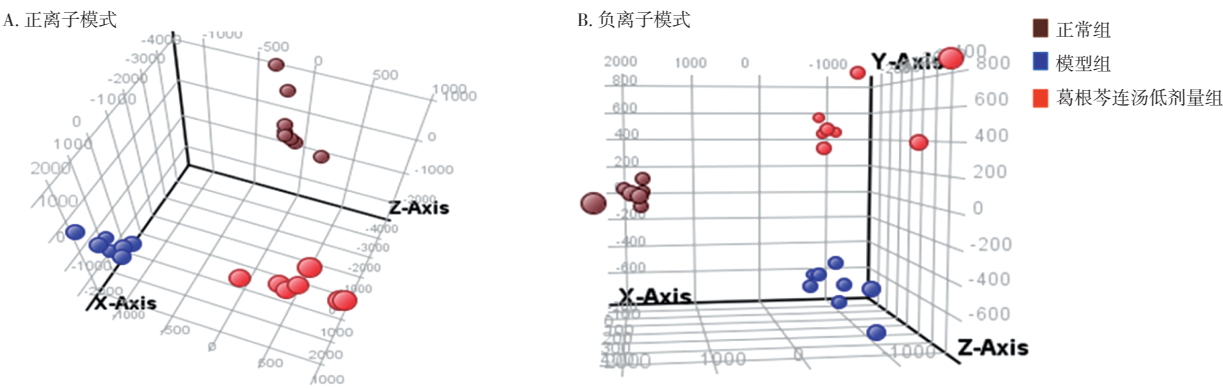


图 2 各组大鼠粪便样本的主成分分析结果
Figure 2 Results of PCA of rats' faeces in different groups

2.1.3 潜在代谢标记物的筛选及鉴定 通过 MPP 软件分析，将满足 $P < 0.05$ ， $FC(\text{Fold change}) > 2$ ， $VIP > 1$ 的变量 List 导出至 Excel 表格，结合二级质谱 (MS/MS) 信息与 HMDB、Metelin 等数据库进行匹配。以保留时间为 0.589 min、 m/z 值为 141.064 2 的化合物为例：通过分子特征提取，得到 $[M+H]^+(m/z\ 141.064\ 2)$ ，分子式 $C_6H_8N_2O_2$ 在 MassHunter 中得分值较高，在 MS/MS 图谱中主要有 $m/z\ 70.063\ 6$ 、 $m/z\ 81.043\ 7$ 、 $m/z\ 95.059\ 2$ 、 $m/z\ 114.087\ 5$ 、 $m/z\ 123.053\ 6$ 的碎片离

子；通过 HMDB 数据库匹配后，确定与内源性代谢物咪唑丙酸标准化合物图谱最为吻合，对应数据库 $m/z\ 70.065\ 7$ 、 $m/z\ 81.045\ 3$ 、 $m/z\ 95.013\ 3$ 、 $m/z\ 114.055\ 5$ 、 $m/z\ 123.055\ 8$ 。因此保留时间为 0.589 min、 m/z 值为 141.064 2 的化合物最终被鉴定为咪唑丙酸，结果见图 3。
利用上述方法最终鉴定出 5 个生物标记物，其在各组中的相对含量采用峰面积表示，结果见表 4。结果显示，与正常组比较，模型组大鼠粪便中的咪唑

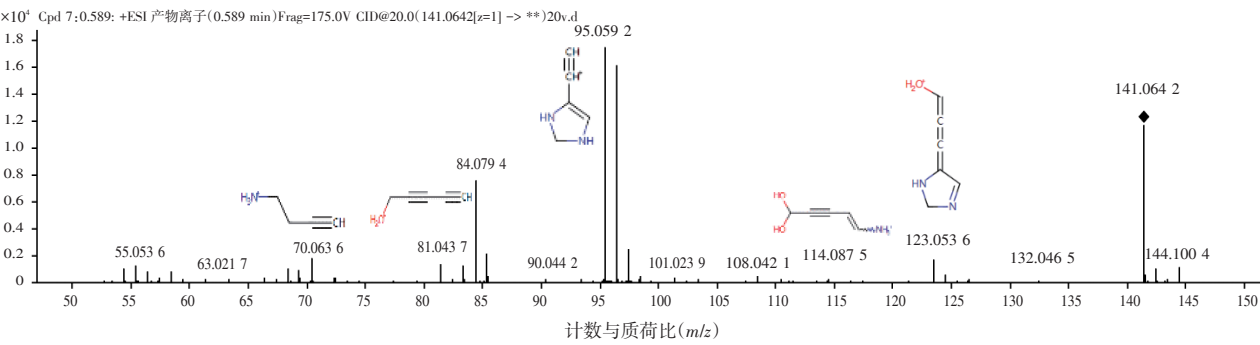


图 3 咪唑丙酸的二级质谱图
Figure 3 MS spectrum of imidazolpropionic acid

表 4 葛根芩连汤对胰岛素抵抗大鼠粪便中关键生物标记物的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)
Table 4 Effects of *Gegen Qin Lian* decoction on key biomarkers of IR rats($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

模式	生物标记物	峰面积/($\times 10^6$)				
		正常组	模型组	造模后变化趋势	葛根芩连汤低剂量组	给药后调节趋势
正离子模式	咪唑丙酸	0.05 $\pm$ 0.03	0.33 $\pm$ 0.26 [*]	↑ [*]	0.22 $\pm$ 0.18	↓
	吡啶丙烯酸	1.60 $\pm$ 0.48	2.22 $\pm$ 0.47 [*]	↑ [*]	2.05 $\pm$ 0.54	↓
	二十碳四烯酸	0.10 $\pm$ 0.02	0.33 $\pm$ 0.16 ^{**}	↑ ^{**}	0.26 $\pm$ 0.07	↓
	二十四碳六烯酸	4.93 $\pm$ 2.63	9.96 $\pm$ 4.16 [*]	↑ [*]	4.58 $\pm$ 2.98 [#]	↓ [#]
负离子模式	十二烷二酸	0.41 $\pm$ 0.16	0.07 $\pm$ 0.04 ^{**}	↓ ^{**}	0.25 $\pm$ 0.19 [#]	↑ [#]

注：与正常组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ ；与模型组比较，[#] $P < 0.05$ 。↑表示上调，↓表示下调

丙酸、吡啶丙烯酸、二十碳四烯酸、二十四碳六烯酸含量明显上升,十二烷二酸含量明显下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);给药 16 周后,葛根芩连汤低剂量能使大鼠肠道中与 IR 相关的内源性代谢物均呈良好回调趋势,与模型组比较,其中二十四碳六烯酸明显下调,十二烷二酸明显上调,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 肠道菌群与生物标记物的关联分析 结果见表 5。共鉴定得到 1 个与二十碳四烯酸显著相关的肠

道菌群 OTU: OTU1001,注释到厚壁菌门消化链球菌科 *Romboutsia* 属。共鉴定得到 5 个与十二烷二酸显著相关的肠道菌群 OTU: OTU1001、OTU1183、OTU1075、OTU1403 及 OTU1164,除与 OTU1001 呈正相关外,其余 OTU 均呈负相关,OTU1001 为二十碳四烯酸和十二烷二酸所共同关联,十二烷二酸涉及到的肠道菌群为厚壁菌门和拟杆菌门。其余 3 个生物标记物未注释到相关联的肠道菌群。

表 5 葛根芩连汤干预胰岛素抵抗大鼠的关键生物标记物关联肠道菌群操作分类单位(OTU)注释

Table 5 Intervention of *Gegen Qin Lian* decoction on key biomarkers associated intestinal flora OTU in IR rats

关联生物标记物	OTU ID	相关性系数	注释结果	功能
二十碳四烯酸	OTU1001	-1.05	厚壁菌门消化链球菌科 <i>Romboutsia</i> 属	与空腹血糖、胰岛素和高密度脂蛋白呈负相关;与总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白呈正相关 ^[16]
十二烷二酸	OTU1001	1.43	厚壁菌门消化链球菌科 <i>Romboutsia</i> 属	
十二烷二酸	OTU1183	-0.08	厚壁菌门瘤胃菌科 <i>Ruminiclostridium_9</i> 属	降解多糖,通过产生乙酸和丁酸等发挥抗炎作用 ^[17-18]
十二烷二酸	OTU1075	-0.26	厚壁菌门瘤胃菌科 <i>Ruminococcaceae_UCG-014</i> 属	改善代谢紊乱 ^[19]
十二烷二酸	OTU1403	-2.24	拟杆菌门拟杆菌科 <i>Bacteroides</i> 属 <i>Bacteroides_cellulosilyticus</i> 种	与胰岛素抵抗及血脂异常呈负相关 ^[20-24]
十二烷二酸	OTU1164	-3.56	拟杆菌门拟杆菌科 <i>Bacteroides</i> 属 <i>Bacteroides_acidifaciens</i> 种	调节胰岛素敏感性、糖耐量异常及能量代谢、抗炎、抗免疫及维持肠道稳态 ^[25-27]

3 讨论

本研究通过检测大鼠空腹血糖(FPG)及空腹胰岛素(FINS)水平,并计算胰岛素抵抗(IR)指数,表明高脂饲料喂养大鼠可成功建立 IR 大鼠模型,且葛根芩连汤低剂量($1.65 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)能够在干预 IR 的同时起到预防 2 型糖尿病(T2DM)的作用。本课题组前期研究^[11]基于 UHPLC/Q-TOF-MS 方法对葛根芩连汤干预 IR 大鼠进行了血清代谢组学分析,表明葛根芩连汤可能通过调节马尿酸、12-去氧胆酸、3-Oxo-4,6-choladienoic acid 和溶血磷脂酰胆碱等关键靶点,干预胆汁酸代谢、磷脂代谢以及肠道菌群代谢等途径,达到预防 T2DM 的目的。

本研究进一步通过粪便代谢组学分析发现,IR 模型大鼠粪便中有 5 个内源性代谢物的含量发生明显变化,而葛根芩连汤低剂量可使之呈现良好的回调趋势。通过 16S rRNA 高通量测序技术对各组大鼠的粪便样品进行测序,基于 Two-part model 分析方法,对肠道菌群与生物标记物进行关联性分析,结果显示二十碳四烯酸和十二烷二酸能够关联到相关的肠道菌群,分别为厚壁菌门消化链球菌科 *Romboutsia* 属;厚壁菌门瘤胃菌科 *Ruminiclostridium_9* 属、*Ruminococcaceae_UCG-014* 属;拟杆菌门拟杆菌科 *Bacteroides* 属 *Bacteroides_cellulosilyticus* 种、*Bacteroides_acidifaciens* 种。提示葛根芩连汤低剂量可能是通过调节内源性代谢物的含量及相关的肠道菌群来预防

T2DM 的发生发展。

咪唑丙酸在体内参与组氨酸代谢^[28]。肠道中存在多种含有尿刊酸还原酶(UrdA)的细菌,组氨酸在 UrdA 的作用下生成咪唑丙酸。肠道代谢紊乱时,咪唑丙酸的含量升高,引起哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)超活化,触发其下游的靶分子核糖体蛋白 S6 激酶(S6K)的负反馈通路,抑制胰岛素受体底物蛋白(IRS)的表达,加速了 IR 的发生^[29-30],咪唑丙酸的含量与 IR 的发生发展存在密切关系^[31-32]。本研究中,IR 模型组大鼠的粪便中咪唑丙酸含量升高,葛根芩连汤低剂量组大鼠体内的咪唑丙酸含量呈回调趋势,可能与肠道菌群的恢复存在一定关系。

吡啶丙烯酸(IA)在体内参与色氨酸代谢,是色氨酸在消化链球菌作用下生成的肠道代谢产物,能够起到保护肠道上皮屏障的作用,还可通过刺激巨噬细胞产生白细胞介素 10(IL-10)来发挥抗炎作用^[33-35]。本研究中,IR 模型组大鼠粪便中的吡啶丙烯酸含量升高,葛根芩连汤低剂量组大鼠体内的吡啶丙烯酸含量呈回调趋势,表明葛根芩连汤可通过肠道菌群来影响色氨酸的代谢。

二十碳四烯酸和二十四碳六烯酸都属于 n-3 多不饱和脂肪酸(n-3PUFAs)。肥胖时服用含有 n-3PUFAs 的食物可以有效改善葡萄糖和脂质代谢^[36];Caesar 等^[37]发现,含有 n-3PUFAs 的食物可以增加小鼠体内有益菌的数量,从而减轻 IR 和炎症反

应。本研究中, IR 模型组大鼠粪便中的二十碳四烯酸、二十四碳六烯酸含量升高, 葛根芩连汤低剂量能够使大鼠体内二十碳四烯酸、二十四碳六烯酸含量呈回调趋势, 表明葛根芩连汤能够调节 n-3PUFAs 的含量, 从而改善 IR。

十二烷二酸(C-12)属于直链二羧酸家族。在 T2DM 患者体内, C-12 能够促进骨骼肌组织中甘油三酯的水解和肝脏中糖原的转化, 还可以降低血糖、血脂及改善 IR, 也可作为一种肠内或肠外的营养物质发挥治疗 T2DM 的作用^[38-40]。本研究中, IR 模型组大鼠粪便内的 C-12 含量下降, 而葛根芩连汤低剂量可以调节其含量。肠道菌群关联结果显示, 与 C-12 相关联的菌群为厚壁菌门和拟杆菌门。

OTU1001 注释到厚壁菌门消化链球菌科 *Romboutsia* 属, 作为二十碳四烯酸和十二烷二酸的共有菌群, 与二十碳四烯酸呈负相关, 与十二烷二酸呈正相关。*Romboutsia* 是梭菌属中新提出的属种, 在体内最终代谢为乙酸盐和甲酸盐^[41-42]。乙酸属于短链脂肪酸(SCFA)的一种, 在肠腔内产生的乙酸盐通过门静脉流入血液和肝脏, 在肝脏中可以促进脂质和胆固醇的合成, 但乙酸盐和脂质代谢之间的具体关系仍存在争议^[43]。近年来研究^[16]表明, *Romboutsia* 的丰度与 FPG、FINS 水平和高密度脂蛋白(HDL-C)之间呈负相关, 与总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)和低密度脂蛋白(LDL-C)呈正相关, 在 T2DM 大鼠体内 *Romboutsia* 丰度明显增加。OTU1183 和 OTU1075 来自厚壁菌门瘤胃菌科, 在属水平上分别注释为 *Ruminiclostridium_9* 和 *Ruminococcaceae_UCG-014*, 与 C-12 呈负相关。厚壁菌在肠道内对体内的营养物质进行消化并维持宿主的健康, 同时也是短链脂肪酸的产生菌群。*Ruminiclostridium_9* 通过酶复合物来降解多糖, 也能生成乙酸和丁酸等物质来发挥抗炎作用^[17-18]。*Ruminococcaceae_UCG-014* 的丰度与高脂饮食密切相关, 高脂饮食诱导的高甘油三酯大鼠体内 *Ruminococcaceae_UCG-014* 的丰度明显降低^[19], 提示 *Ruminiclostridium* 家族可能是代谢改变的关键因素。

拟杆菌在肠道内的丰度与肥胖的发生发展密切相关^[44]。OTU1403 在种水平上注释到 *Bacteroides_cellulosilyticus*, 与 C-12 呈负相关。与 *Ruminiclostridium_9* 作用相似, *Bacteroides_cellulosilyticus* 也可以分解纤维素, 通过摄入高水溶性黏性纤维膳食诱导肠道中 *Bacteroides_cellulosilyticus* 的生长, 增加胃肠道纤维的凝胶形成能力, 延迟胃排空和抑制葡萄糖及胆固醇吸收, 最终代谢为乙酸盐、丙酸盐和琥珀酸盐^[20-23]。*Bacteroides_cellulosilyticus* 的丰度与 IR 及血脂异常呈

负相关^[24]。OTU1164 在种水平上注释为 *Bacteroides_acidifaciens* (BA), 与 C-12 呈负相关。*Bacteroides_acidifaciens* 是从小鼠盲肠中分离的一种细菌, 在体内发挥有益菌的作用, 如调节胰岛素敏感性、糖耐量异常、脂质代谢、抗炎及能量代谢等^[25-27]。给予低剂量葛根芩连汤后, *Romboutsia* 与二十碳四烯酸的变化趋势相反, 与十二烷二酸变化趋势一致; *Ruminiclostridium_9*、*Ruminococcaceae_UCG-014*、*Bacteroides_cellulosilyticus* 及 *Bacteroides_acidifaciens* 与十二烷二酸变化趋势相反。结果表明葛根芩连汤可能是通过影响厚壁菌和拟杆菌的丰度来调节内源性代谢物的变化, 具体机制有待进一步证实。

综上所述, 本研究应用 UHPLC/Q-TOF-MS 及 16S rRNA 高通量测序技术, 分析了 IR 大鼠及葛根芩连汤干预后大鼠肠道内源性代谢物及相关菌群的变化, 共鉴定出 5 个生物标记物与 IR 密切相关, 表明葛根芩连汤可能通过有效调节脂肪酸类物质及厚壁菌门和拟杆菌门的肠道菌群水平来改善 IR 和脂质代谢。葛根芩连汤对 IR 大鼠肠道代谢紊乱具有调节作用, 这为从肠道内源性代谢物及肠道微生态角度探讨葛根芩连汤的作用机制提供了依据。

参考文献:

- [1] QI T, LI X Q, SONG P P, et al. Optimal cut-off values for the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) and pre-diabetes screening: developments in research and prospects for the future[J]. Drug Discoveries & Therapeutics, 2016, 9(6): 380-385.
- [2] HAN J L, LIN H L. Intestinal microbiota and type 2 diabetes: from mechanism insights to therapeutic perspective[J]. World Journal of Gastroenterology, 2014, 20(47): 17737-17745.
- [3] PITOCOCCO D, DI LEO M, TARTAGLIONE L, et al. The role of gut microbiota in mediating obesity and diabetes mellitus[J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2020, 24(3): 1548-1562.
- [4] 禚立平, 徐敏, 刘瑞欣, 等. 肠道菌群与2型糖尿病研究现状及进展[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2016, 32(12): 1041-1044.
- [5] 赵林华, 连凤梅, 姬航宇, 等. 全小林教授运用不同剂量葛根芩连汤治疗2型糖尿病验案[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 249-251.
- [6] 孙洪平, 范尧夫, 刘超. 葛根芩连汤治疗糖尿病的研究进展[J]. 临床医药实践, 2019, 28(12): 934-937.
- [7] XU J, LIAN F, ZHAO L, et al. Structural modulation of gut microbiota during alleviation of type 2 diabetes with a Chinese herbal formula[J]. Isme Journal, 2015, 9(3): 552-562.
- [8] 农菲菲, 罗爽, 赵钟祥, 等. 基于UPLC/Q-TOF-MS技术的大黄牡丹汤治疗IBD大鼠的血清代谢组学研究[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(5): 571-579.
- [9] HUANG H J, ZHANG A Y, CAO H C, et al. Metabolomic analyses of faeces reveals malabsorption in cirrhotic patients[J]. Digestive & Liver Disease, 2013, 45(8): 677-682.
- [10] ZIERER J, JACKSON M A, KASTENMÜLLER G, et al. The fecal metabolome as a functional readout of the gut microbiome[J].

- Nature Genetics, 2018, 50(6): 790–795.
- [11] 周子妍, 曾国威, 盛译萱, 等. 葛根芩连汤干预2型糖尿病前期大鼠的代谢机制研究[J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(2): 245–251.
 - [12] 刘宇政, 章军, 王跃生, 等. 葛根芩连汤剂量相关问题探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(16): 216–218.
 - [13] 姚亮亮, 盛译萱, 曾国威, 等. 葛根芩连汤干预高脂血症肥胖大鼠的粪便代谢组学研究[J]. 中药药理与临床, 2020, 36(3): 47–52.
 - [14] 姜瓊娜, 曾治君, 傅灵艳, 等. 基于肠道菌群研究葛根芩连汤降脂并预防血糖升高的作用机制[J]. 中国药房, 2020, 31(15): 1823–1829.
 - [15] FU J, BONDER M J, CENIT M C, et al. The Gut microbiome contributes to a substantial proportion of the variation in blood lipids [J]. Circulation Research, 2015, 117(9): 817–824.
 - [16] WANG Y, OUYANG M, GAO X, et al. Phocaea, pseudoflavonifactor and lactobacillus intestinalis: three potential biomarkers of gut microbiota that affect progression and complications of obesity-induced type 2 diabetes mellitus[J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2020, 13: 835–850.
 - [17] GUO J R, DONG X F, LIU S, et al. High-throughput sequencing reveals the effect of *Bacillus subtilis* CGMCC 1.921 on the cecal microbiota and gene expression in ileum mucosa of laying hens[J]. Poultry Science, 2018, 97(7): 2543–2556.
 - [18] XIAO S, LIU C, CHEN M, et al. *Scutellariae radix* and *coptidis rhizoma* ameliorate glycolipid metabolism of type 2 diabetic rats by modulating gut microbiota and its metabolites[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(1): 303–317.
 - [19] HUANG C, CHEN J, WANG J, et al. Dysbiosis of intestinal microbiota and decreased antimicrobial peptide level in paneth cells during hypertriglyceridemia-related acute necrotizing pancreatitis in rats[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 776–785.
 - [20] Flint H J, Scott K P, Duncan S H, et al. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut[J]. Gut Microbes, 2012, 3(4): 289–306.
 - [21] BRAHE L K, LE CHATELIER E, PRIFTI E, et al. Specific gut microbiota features and metabolic markers in postmenopausal women with obesity[J]. Nutrition & Diabetes, 2015, 5(6): 159–168.
 - [22] DIKEMAN C L, FAHEY G C. Viscosity as related to dietary fiber: a review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2006, 46(8): 649–663.
 - [23] ROBERT C, CHASSARD C, LAWSON P A, et al. *Bacteroides cellulosilyticus* sp. nov., a cellulolytic bacterium from the human gut microbial community[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(7): 1516–1520.
 - [24] BRAHE L K, LE CHATELIER E, PRIFTI E, et al. Specific gut microbiota features and metabolic markers in postmenopausal women with obesity[J]. Nutrition & Diabetes, 2015, 5(6): 159–170.
 - [25] MIYAMOTO Y, ITOH K. *Bacteroides acidifaciens* sp. nov., isolated from the caecum of mice[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50(1): 145–148.
 - [26] YANG J Y, LEE Y S, KIM Y, et al. Gut commensal *bacteroides acidifaciens* prevents obesity and improves insulin sensitivity in mice [J]. Mucosal Immunology, 2017, 10(1): 104–116.
 - [27] YANAGIBASHI T, HOSONO A, OYAMA A, et al. IgA production in the large intestine is modulated by a different mechanism than in the small intestine: *bacteroides acidifaciens* promotes IgA production in the large intestine by inducing germinal center formation and increasing the number of IgA⁺B cells[J]. Immunobiology, 2013, 218(4): 645–651.
 - [28] KOH A, BÄCKHED F. From association to causality: the role of the gut microbiota and its functional products on host metabolism[J]. Molecular Cell, 2020, 78(4): 584–596.
 - [29] KOH A, MOLINARO A, STÅHLMAN M, et al. Microbially produced imidazole propionate impairs insulin signaling through mTORC1[J]. Cell, 2018, 175(4): 947–961.
 - [30] ZONCU R, EFEYAN A, SABATINI D M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2011, 12(1): 21–35.
 - [31] HOLEČEK M. Histidine in health and disease: metabolism, physiological importance, and use as a supplement[J]. Nutrients, 2020, 12(3): 848–856.
 - [32] 王天琦, 余琼卫, 冯钰琦. 基于氧化镍沉积硅胶固相萃取与液相色谱-质谱联用技术的2型糖尿病血清中咪唑丙酸的检测[J]. 高等学校化学学报, 2020, 41(2): 262–267.
 - [33] WLODARSKA M, LUO C, KOLDE R, et al. Indoleacrylic acid produced by commensal *peptostreptococcus* species suppresses inflammation[J]. Cell Host & Microbe, 2017, 22(1): 25–37.
 - [34] DOU L, BERTRAND E, CERINI C, et al. The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair[J]. Kidney International, 2004, 65(2): 442–451.
 - [35] LEE J, JAYARAMAN A, WOOD T K. Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA[J]. BMC Microbiol, 2007, 7: 42–57.
 - [36] STEPANKOVA M, BARTONKOVA I, JISKROVA E, et al. Methylindoles and methoxyindoles are agonists and antagonists of human aryl hydrocarbon receptor[J]. Molecular Pharmacology, 2018, 93(6): 631–644.
 - [37] GAO J, XU K, LIU H, et al. Impact of the gut microbiota on intestinal immunity mediated by tryptophan metabolism[J]. Frontiers in Cellular & Infection Microbiology, 2018, 8(13): 13–35.
 - [38] BELLENGER J, BELLENGER S, ESCOULA Q, et al. N-3 polyunsaturated fatty acids: an innovative strategy against obesity and related metabolic disorders, intestinal alteration and gut microbiota dysbiosis[J]. Biochimie, 2019, 159: 66–71.
 - [39] CAESAR R, TREMAROLI V, KOVATCHEVA-DATCHARY P, et al. Crosstalk between gut microbiota and dietary lipids aggravates WAT inflammation through TLR signaling[J]. Cell Metabolism, 2015, 22(4): 658–668.
 - [40] MINGRONE G, CASTAGNETO-GISSEY L, MACÉ K. Use of dicarboxylic acids in type 2 diabetes[J]. British Journal of Clinical Pharmacology, 2013, 75(3): 671–676.
 - [41] ZHAO L, CHEN Y, XIA F, et al. A glucagon-like peptide-1 receptor agonist lowers weight by modulating the structure of gut microbiota[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2018, 9: 233–245.
 - [42] GERRITSEN J, FUENTES S, GRIEVINK W, et al. Characterization of *Romboutsia ilealis* gen. nov., sp. nov., isolated from the gastro-intestinal tract of a rat, and proposal for the reclassification of five closely related members of the genus *Clostridium* into the genera *Romboutsia* gen. nov., *Intestinibacter* gen. nov., *Terrisporobacter* gen. nov. and *Asaccharospora* gen. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(5): 1600–1616.
 - [43] SANZ Y, SANTACRUZ A, DE PALMA G. Insights into the roles of gut microbes in obesity[J]. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases, 2008, 2008(14): e829101.
 - [44] LEY R E, BÄCKHED F, TURNBAUGH P, et al. Obesity alters gut microbial ecology[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005, 102(31): 11070–11075.

(编辑: 邹元平)