

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.01.012

## 益糖康对 2 型糖尿病模型大鼠糖脂代谢和肠道菌群的影响

韩雪莹, 单国顺, 杨宇峰, 王玲玲, 窦德强, 于嘉祥, 石岩<sup>✉</sup>

辽宁中医药大学, 辽宁省沈阳市皇姑区崇山东路 79 号, 110847

**[摘要]** **目的** 探讨益糖康治疗 2 型糖尿病的可能作用机制。**方法** 采用高脂饲料喂养结合一次性腹腔注射链脲佐菌素 45 mg/kg 制备 2 型糖尿病大鼠模型。将造模成功的 32 只 SD 大鼠随机分为模型组、益糖康组、二甲双胍组、益生菌组, 每组 8 只, 另设普通饲料喂养的 SD 大鼠 8 只作为空白组。益糖康组给予益糖康生药 56 g/(kg·d) 灌胃, 二甲双胍组给予盐酸二甲双胍片 150 mg/(kg·d) 灌胃, 益生菌组给予益生菌冲剂 150 mg/(kg·d) 灌胃, 空白组、模型组给予 0.1 ml/10 g 生理盐水灌胃, 各组均每日 1 次。灌胃 4 周后, HE 染色观察各组大鼠肠组织病理形态, 测定血糖、胰岛素 (INS)、糖化血红蛋白 (HbA1c)、总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 水平; 采用 16S rRNA 技术测定各组大鼠肠内容物的肠道菌群结构, 进行  $\alpha$  多样性指数分析、物种组成分析、LEfSe 多级物种差异判别分析、COG 功能注释, 并对差异肠道菌群与血糖、血脂指标的相关性进行分析。**结果** 病理结果显示, 模型组、益生菌组均可见大量的肠绒毛顶端上皮细胞脱落; 二甲双胍组偶见炎性细胞灶性浸润; 益糖康组脱落的肠绒毛顶端上皮细胞较模型组明显减少。与空白组比较, 模型组大鼠血糖、INS、HbA1c、TC、TG、LDL-C 水平及 coverage 指数升高, HDL-C 水平、shannon 指数、chao 指数降低, 肠道菌群中放线菌门和变形菌门丰度升高, 拟杆菌门丰度降低 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。与模型组比较, 二甲双胍组和益糖康组血糖、INS、HbA1c、TC、TG、LDL-C 水平降低, HDL-C 水平、shannon 指数升高, 益生菌组血糖、coverage 指数降低; 二甲双胍组变形菌门丰度降低、疣微菌门丰度升高, 益糖康组拟杆菌门、疣微菌门升高而变形菌门降低, 益生菌组拟杆菌门、疣微菌门升高而放线菌门、其他菌门降低 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。与二甲双胍组比较, 益糖康组各指标差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。与益糖康组比较, 益生菌组血糖、INS、HbA1c、TG、LDL-C 水平均升高, HDL-C 水平、shannon 指数降低, 拟杆菌门、变形菌门丰度升高而放线菌门、其他菌门丰度降低 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。差异判别分析显示, 空白组有 53 个差异菌群 (属), 模型组有 8 个差异菌群 (属), 二甲双胍组有 13 个差异菌群 (属), 益糖康组有 11 个差异菌群 (属), 益生菌组有 5 个差异菌群 (属)。COG 功能分类研究表明, 差异菌群显著影响碳水化合物转运和代谢, 氨基酸转运和代谢, 转录, 复制、重组和修复, 翻译、核糖体结构和生物发生等通路。相关性分析显示, 变形菌门与 INS 和 TC 水平呈显著正相关 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。**结论** 益糖康可调节 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢, 效果与二甲双胍相当而优于益生菌, 其机制可能与改善肠道菌群的组成和结构有关。

**[关键词]** 2 型糖尿病; 糖脂代谢; 肠道菌群; 益糖康; 二甲双胍; 益生菌

**基金项目:** 中国博士后科学基金(2021M693852); 辽宁省“兴辽英才计划”青年拔尖人才资助项目(XLYC1807145); 辽宁省人社厅百千万人才资助项目(2020921039); 辽宁省科技厅博士科研启动课题(2021-BS-183); 辽宁中医药大学 2020 年博士后启动基金(21601A2011)

<sup>✉</sup> 通讯作者: shiyan@lnutcm.edu.cn; (024)31207185

糖尿病属于中医学“消渴”“消瘴”等范畴。近年来糖尿病患者逐年增加,目前我国糖尿病发病率已达到 11.2%,其中尤以 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)为主<sup>[1-2]</sup>,其已成为严重危害我国人民健康并给社会医疗带来沉重负担的重大公共卫生问题。《灵枢·本藏》云:“脾脆则善病消瘴易伤”,指出在糖尿病的病机及辨证中脾虚的关键作用。研究<sup>[3-4]</sup>表明,脾虚与肠道微生态关系密切,脾虚影响机体消化吸收功能,破坏各脏器间平衡,进而导致肠道菌群失调;而肠道菌群失调又会影响物质营养代谢,进一步加重脾虚症状。另有研究<sup>[5-6]</sup>显示,糖尿病的发生、发展与肠道菌群密切相关,调节肠道菌群的稳态是治疗糖尿病的重要手段。益糖康是课题组以国家中药保护品种“降糖丹”为基础研制而成,前期临床研究<sup>[7]</sup>和动物实验<sup>[8]</sup>已证明其对 T2DM 有较好的防治作用,可以有效调节糖脂代谢。本研究从肠道微生态的角度探讨益糖康调节糖脂代谢治疗 T2DM 的可能作用机制,以期对益糖康的临床应用提供依据。本研究已通过辽宁中医药大学动物实验伦理委员会伦理学审查(批号:21000042020033)。

## 1 材料

### 1.1 药物

益糖康由黄芪、茯苓、白术、黄精、人参、枸杞子、黄连、丹参、三七、大黄、连翘、甘草(14:6:6:12:6:6:6:6:3:3:6:4)组成,药物购于辽宁中医药大学附属医院门诊药局,制备成含生药 2 g/ml 的药液。益生菌冲剂[3 种菌种:瑞士乳杆菌、嗜酸乳杆菌、两歧双歧杆菌,合生元(广州)健康产品有限公司,国药健字:G20090356];格华止(盐酸二甲双胍片,中美上海施贵宝制药有限公司,批号:1407082);链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司,批号:V900890)。

### 1.2 动物及饲料

SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只,体质量(200±20)g,购自辽宁长生生物技术有限公司,实验动物合格证号:SCXK(辽)2015-0001。高脂饲料由辽宁中医药大学实验中心生产,组成:6%蛋黄粉,10%猪油,8%蔗糖,1%胆酸钠,1%胆固醇,74%普通饲料。

### 1.3 主要试剂及仪器

DNA 抽提试剂盒(美国 Omega Bio-Tek 公司,批号:D5625-04);16S rRNA 测序试剂盒(美国

Illumina 公司,批号:15043895);HE 染色试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号:C0105);胰岛素(INS,批号:202101)、糖化血红蛋白(HbA1c,批号:202101)试剂盒,上海优选生物科技有限公司;甘油三酯(TG,批号:20210115)、总胆固醇(TC,批号:20210115)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C,批号:20210115)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C,批号:20210115)试剂盒,南京建成生物工程研究所;AxyPrep DNA Gel Extraction 试剂盒(美国 Axygen 公司,批号:AP-GX-250G);NEXTFLEX Rapid DNA-Seq 试剂盒(美国 Bioo Scientific 公司,批号:5144-08)。

高速台式冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司,型号:Eppendorf 5424R);PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司,型号:Gene Amp<sup>®</sup> 9700);QuantiFluor-ST 蓝色荧光定量系统(美国 Promega 公司,型号:Quantus<sup>™</sup> Fluorometer);高通量二代测序仪(美国 Illumina 公司,型号:Miseq);电泳仪(北京市六一仪器厂,型号:DYY-6C);移液器(德国 Eppendorf 公司,型号:N13462C);酶标仪(美国 Bio Tek 公司,型号:ELx800);正置白光拍照显微镜(日本 Nikon 公司,型号:Eclipse Ci-L);扫描浏览软件 2.4、全景切片扫描仪(型号:PANNORAMIC),匈牙利 3DHISTECH 公司;三诺 GA-3 型血糖仪、易准 GA-3 型血糖试纸,三诺生物传感股份有限公司。

## 2 方法

### 2.1 造模、分组及给药

40 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后,按体质量由低到高排序,用随机数字表抽取 8 只大鼠设为空白组,予普通饲料喂养,其他 32 只大鼠予高脂饲料喂养,均自由进食(约 20 g)饮水。参照文献[9]制备 T2DM 大鼠模型:32 只大鼠经高脂饲料喂养 4 周后禁食不禁水 12 h,一次性腹腔注射 STZ 45 mg/kg,注射时用柠檬酸缓冲液(pH 4.2~4.5)以 1% 的浓度溶解。72 h 后,连续 3 天同一时间尾静脉采血检测各组大鼠血糖水平,3 次检测均大于 16.7 mmol/L 认定为 T2DM 模型成功<sup>[9]</sup>。32 只大鼠均造模成功,按血糖水平由低到高排序,然后用随机数字表分为模型组、益糖康组、二甲双胍组、益生菌组,每组 8 只。二甲双胍组给予盐酸二甲双胍片 150 mg/(kg·d)灌胃,益生菌组给予益生菌冲剂 150 mg/(kg·d)灌胃,益糖康组根据前期研究结果<sup>[8]</sup>给予益糖康

生药 56 g/(kg·d) 灌胃, 空白组和模型组大鼠均灌胃生理盐水 0.1 ml/10 g。各组均每日 1 次, 连续灌胃 4 周。给药期间空白组大鼠给予普通饲料喂养, 其余各组予高脂饲料喂养。

## 2.2 血糖测定及样本收集

各组大鼠末次给药后禁食 12 h, 血糖仪测定大鼠尾尖静脉血的血糖水平。以 1% 戊巴比妥钠 4 ml/kg 腹腔注射麻醉后, 腹主动脉取血, 肝素抗凝, 2500 r/min、4℃离心(离心半径 10 cm)20 min, 取上清液, -80℃保存待用。

各组大鼠取血后迅速打开腹部, 取出肠组织, 其中肠内容物用无菌管收集, -80℃冻存, 用于进行肠道菌群实验; 肠组织用 4% 多聚甲醛固定, 用于观察肠组织病理形态。

## 2.3 肠组织病理形态

4% 多聚甲醛固定肠组织, 脱水, 石蜡包埋, 切片, HE 染色, 光镜下观察肠组织病理形态。

## 2.4 血糖、血脂相关指标

应用酶联免疫吸附法(ELISA)测定大鼠血浆中 HbA1c、INS 水平, 生化法测血浆中 TG、TC、HDL-C 和 LDL-C 水平, 具体操作严格按照试剂盒说明书进行。

## 2.5 16S rRNA 扩增子测序检测

各组大鼠用随机数字表法抽取 6 只大鼠的肠道内容物样本, 采用 DNA 抽提试剂盒提取, 操作参照试剂盒说明, 再对得到的总 DNA 进行纯度、浓度及完整性的检测。选取细菌 16S rRNA 基因高度可变的 V3-V4 区进行 PCR 扩增: 上游引物 338F (ACTCCTACGGGAGGCAGCAG), 下游引物 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT), 引物长度 280 bp。每个样本 3 个 PCR 重复, 将 3 个重复的 PCR 产物混合, 并使用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测产物。使用 AxyPrep DNA Gel Extraction 试剂盒切胶回收, 进行 PCR 产物纯化, 2% 琼脂糖电泳检测纯度。将 PCR 产物用 QuantiFluor-ST 蓝色荧光定量系统进行定量, 之后按照每个样本的测序量要求进行相应比例的混合。使用 NEXTFLEX Rapid DNA-Seq 试剂盒进行建库, 利用 Illumina 公司的 Miseq PE300 平台进行测序。

## 2.6 生物信息分析流程

使用 fastp 0.20.0 软件 (<https://github.com/OpenGene/fastp>) 原始测序序列进行质控, 使用 FLASH 1.2.7 软件 (<http://www.cbcb.umd.edu/software/flash>) 进行拼接, 同时对序列质量进行质

控和过滤, 区分样本后进行分类单元(OTU)聚类分析和物种分类学分析。基于 OTU 聚类分析结果, 通过  $\alpha$  多样性指数分析可以得到群落中物种的多样性、丰度、覆盖度等信息, 其中 shannon 指数可反映群落多样性, chao 指数可反映群落丰度, coverage 指数可反映群落覆盖度。进一步对测序深度进行检测, 基于分类学信息, 在各个分类水平上进行群落结构分析, 依次进行物种组成分析、LEfSe ([http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/root?tool\\_id=lefse\\_upload](http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/root?tool_id=lefse_upload)) 多级物种差异判别分析、COG 功能注释 ([http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/root?tool\\_id=PICRUST\\_normalize](http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/root?tool_id=PICRUST_normalize))。

## 2.7 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。计量资料符合正态分布者以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法; 不符合正态分布者用中位数和四分位数 [ $M(Q1, Q3)$ ]表示, 多组间比较采用 Kruskal-Wallis  $H$  检验, 两两比较采用秩转换的方差分析。差异肠道菌群(基于门水平)与血糖、血脂的相关性采用 Spearman 相关分析。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 各组大鼠血糖相关指标比较

表 1 示, 与空白组比较, 模型组血糖、INS、HbA1c 水平升高 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 二甲双胍组和益糖康组血糖、INS、HbA1c 水平降低 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 益生菌组大鼠血糖降低 ( $P<0.05$ ); 与二甲双胍组比较, 益生菌组血糖、INS、HbA1c 水平均升高 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 益糖康组各指标差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 与益糖康组比较, 益生菌组血糖、INS、HbA1c 水平均显著升高 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。

表 1 各组大鼠血糖相关指标比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别    | 鼠数 | 血糖/mm $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | INS/mU $\cdot\text{L}^{-1}$       | HbA1c/%                          |
|-------|----|--------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| 空白组   | 8  | 4.93 $\pm$ 0.49                      | 29.55 $\pm$ 2.15                  | 4.06 $\pm$ 0.39                  |
| 模型组   | 8  | 18.13 $\pm$ 1.50 <sup>a)</sup>       | 41.34 $\pm$ 3.89 <sup>a)</sup>    | 5.37 $\pm$ 0.62 <sup>a)</sup>    |
| 二甲双胍组 | 8  | 9.33 $\pm$ 2.28 <sup>b)</sup>        | 34.06 $\pm$ 2.59 <sup>b)</sup>    | 4.47 $\pm$ 0.41 <sup>b)</sup>    |
| 益糖康组  | 8  | 6.48 $\pm$ 1.29 <sup>b)</sup>        | 35.47 $\pm$ 2.74 <sup>b)</sup>    | 4.60 $\pm$ 0.53 <sup>c)</sup>    |
| 益生菌组  | 8  | 15.12 $\pm$ 1.47 <sup>c) d) f)</sup> | 40.61 $\pm$ 1.77 <sup>c) f)</sup> | 5.41 $\pm$ 0.42 <sup>c) g)</sup> |

注: INS, 胰岛素; HbA1c, 糖化血红蛋白。

a) 与空白组比较,  $P<0.01$ ; b) 与模型组比较,  $P<0.01$ ; c) 与模型组比较,  $P<0.05$ ; d) 与二甲双胍组比较,  $P<0.05$ ; e) 与二甲双胍组比较,  $P<0.01$ ; f) 与益糖康组比较,  $P<0.01$ ; g) 与益糖康组比较,  $P<0.05$ 。

3.2 各组大鼠血脂相关指标比较

表 2 示, 与空白组比较, 模型组 TC、TG、LDL-C 水平升高, HDL-C 水平降低 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ); 与模型组比较, 二甲双胍组和益糖康组 TG、LDL-C 水平降低, HDL-C 水平升高 ( $P<0.01$ ); 与二甲双胍组比较, 益生菌组 TG、LDL-C 水平均升高, HDL-C 水平降低 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 益糖康组各指标差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 与益糖康组比较, 益生菌组 TG、LDL-C 水平均升高, HDL-C 水平降低 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。

3.3 各组大鼠肠组织病理形态结果

图 1 示 (扫描本文二维码获取彩图), 空白组

大鼠肠组织各层结构清晰, 黏膜层上皮完整, 肠腺数量丰富、排列紧密; 模型组、益生菌组均可见大量的肠绒毛顶端上皮细胞脱落; 二甲双胍组偶见炎性细胞灶性浸润; 益糖康组脱落的肠绒毛顶端上皮细胞较模型组明显减少, 未见明显的炎性改变。

3.4 各组大鼠肠道菌群分析

3.4.1  $\alpha$  多样性分析 表 3 示, 与空白组比较, 各组 shannon 指数、chao 指数均降低 ( $P<0.01$ ), 模型组 coverage 指数升高 ( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 二甲双胍组、益糖康组 shannon 指数均升高, 益生菌组 coverage 指数降低 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ); 与益糖康组比较, 益生菌组 shannon 指数降

表 2 各组大鼠血脂相关指标比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别    | 鼠数 | TC/mmol·L-1             | TG/mmol·L-1                | HDL-C/nmol·L-1             | LDL-C/nmol·L-1             |
|-------|----|-------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 空白组   | 8  | 3.65±0.23               | 0.78±0.07                  | 2.94±0.36                  | 1.18±0.11                  |
| 模型组   | 8  | 4.17±0.25 <sup>a)</sup> | 1.12±0.12 <sup>b)</sup>    | 1.58±0.32 <sup>b)</sup>    | 2.38±0.39 <sup>b)</sup>    |
| 二甲双胍组 | 8  | 3.90±0.29               | 0.87±0.16 <sup>c)</sup>    | 2.42±0.35 <sup>c)</sup>    | 1.35±0.23 <sup>c)</sup>    |
| 益糖康组  | 8  | 3.83±0.25               | 0.76±0.12 <sup>c)</sup>    | 2.52±0.23 <sup>c)</sup>    | 1.21±0.13 <sup>c)</sup>    |
| 益生菌组  | 8  | 3.83±0.52               | 1.08±0.11 <sup>d)</sup> f) | 1.71±0.35 <sup>d)</sup> g) | 2.23±0.32 <sup>c)</sup> g) |

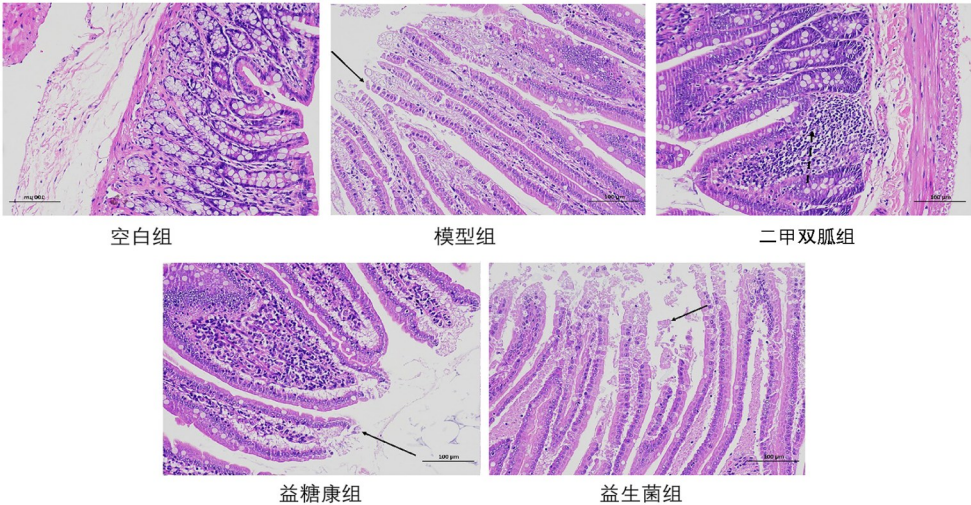
注: TG, 甘油三酯; TC, 总胆固醇; HDL-C, 高密度脂蛋白胆固醇; LDL-C, 低密度脂蛋白胆固醇。

a) 与空白组比较,  $P<0.05$ ; b) 与空白组比较,  $P<0.01$ ; c) 与模型组比较,  $P<0.01$ ; d) 与二甲双胍组比较,  $P<0.05$ ; e) 与二甲双胍组比较,  $P<0.01$ ; f) 与益糖康组比较,  $P<0.05$ ; g) 与益糖康组比较,  $P<0.01$ 。

表 3 各组大鼠肠道菌群  $\alpha$  多样性分析结果比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别    | 鼠数 | shannon 指数                     | chao 指数                     | coverage 指数                 |
|-------|----|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 空白组   | 6  | 4.3293±0.1813                  | 631.05±38.99                | 0.9976±0.0003               |
| 模型组   | 6  | 3.1011±0.1804 <sup>a)</sup>    | 391.97±69.98 <sup>a)</sup>  | 0.9982±0.0004 <sup>b)</sup> |
| 二甲双胍组 | 6  | 3.5239±0.3037 <sup>a)</sup> c) | 415.69±65.37 <sup>a)</sup>  | 0.9981±0.0005               |
| 益糖康组  | 6  | 3.6398±0.1993 <sup>a)</sup> d) | 421.21±59.59 <sup>a)</sup>  | 0.9979±0.0004               |
| 益生菌组  | 6  | 3.0787±0.3565 <sup>a)</sup> e) | 452.04±115.19 <sup>a)</sup> | 0.9976±0.0004 <sup>c)</sup> |

注: a) 与空白组比较,  $P<0.01$ ; b) 与空白组比较,  $P<0.05$ ; c) 与模型组比较,  $P<0.05$ ; d) 与模型组比较,  $P<0.01$ ; e) 与益糖康组比较,  $P<0.05$ 。



注: 黑色实线箭头所指均为脱落的上皮细胞, 黑色虚线箭头所指为炎性细胞灶性浸润。

图 1 各组大鼠肠组织病理形态染色图 (HE 染色,  $\times 200$ )

低 ( $P<0.05$ )。

3.4.2 物种组成分析 表 4 示, 与空白组比较, 模型组肠道菌群中放线菌门和变形菌门丰度升高, 拟杆菌门丰度降低 ( $P<0.01$ )。与模型组比较, 二甲双胍组变形菌门丰度降低, 疣微菌门丰度升高; 益糖康组拟杆菌门、疣微菌门升高, 变形菌门降低; 益生菌组拟杆菌门、疣微菌门升高, 放线菌门、其他菌门降低 ( $P<0.05$ )。二甲双胍组和益糖康组各菌门间丰度比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。与二甲双胍组和益糖康组比较, 益生菌组拟杆菌门、变形菌门丰度升高, 而放线菌门、其他菌门丰度降低 ( $P<0.01$ ); 与二甲双胍组比较, 益生菌组疣微菌门丰度降低 ( $P<0.01$ )。

3.4.3 LEfSe 多级物种差异判别分析 比较各给药组对差异菌群的调节作用, 进一步研究大鼠肠道菌群的属级差异。选择线性判别分析 (LDA)  $>2$  且  $P<0.05$  的不同菌群 (属级) 作为差异菌群, 结果显示, 空白组有 53 个差异菌群 (属), 模型组有 8 个差异菌群 (属), 二甲双胍组有 13 个差异菌群 (属), 益糖康组有 11 个差异菌群 (属), 益生菌组有 5 个差异菌群 (属)。

3.4.4 COG 功能注释 表 5 示, 各组大鼠肠道菌群 COG 各功能水平的注释信息相近, 而各功能在不同组间的丰度信息不同, 差异菌群显著影响碳水化合物转运和代谢, 氨基酸转运和代谢, 转录, 复制、重组和修复, 翻译、核糖体结构和生物发生,

表 4 各组大鼠肠道菌群基于门水平的物种构成比较 (% ,  $\bar{x}\pm s$ )

| 组别    | 鼠数 | 厚壁菌门              | 拟杆菌门                                  | 放线菌门                                | 变形菌门                               | 疣微菌门                             | 其他                                  |
|-------|----|-------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| 空白组   | 6  | 71.79 $\pm$ 10.02 | 22.78 $\pm$ 8.44                      | 2.06 $\pm$ 1.35                     | 2.96 $\pm$ 2.84                    | 0.07 $\pm$ 0.14                  | 0.22 $\pm$ 0.40                     |
| 模型组   | 6  | 67.57 $\pm$ 5.07  | 1.57 $\pm$ 0.85 <sup>a)</sup>         | 12.68 $\pm$ 6.62 <sup>a)</sup>      | 17.99 $\pm$ 7.13 <sup>a)</sup>     | 0.03 $\pm$ 0.02                  | 0.14 $\pm$ 0.18                     |
| 二甲双胍组 | 6  | 74.64 $\pm$ 3.21  | 3.51 $\pm$ 3.52                       | 13.59 $\pm$ 2.60                    | 5.84 $\pm$ 4.52 <sup>b)</sup>      | 1.97 $\pm$ 1.44 <sup>b)</sup>    | 0.42 $\pm$ 0.54                     |
| 益糖康组  | 6  | 73.63 $\pm$ 4.61  | 6.34 $\pm$ 6.10 <sup>b)</sup>         | 12.85 $\pm$ 4.42                    | 5.76 $\pm$ 6.46 <sup>b)</sup>      | 1.14 $\pm$ 1.76 <sup>b)</sup>    | 0.22 $\pm$ 0.23                     |
| 益生菌组  | 6  | 66.99 $\pm$ 19.76 | 13.68 $\pm$ 10.57 <sup>b) c) d)</sup> | 6.46 $\pm$ 6.36 <sup>b) c) d)</sup> | 11.83 $\pm$ 16.38 <sup>c) d)</sup> | 0.83 $\pm$ 1.26 <sup>b) c)</sup> | 0.03 $\pm$ 0.02 <sup>b) c) d)</sup> |

注: a) 与空白组比较,  $P<0.01$ ; b) 与模型组比较,  $P<0.05$ ; c) 与二甲双胍组比较,  $P<0.01$ ; d) 与益糖康组比较,  $P<0.01$ 。

表 5 各组大鼠肠道菌群 COG 功能丰度

| 功能描述               | 空白组     | 模型组     | 二甲双胍组   | 益糖康组    | 益生菌组    |
|--------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 碳水化合物转运和代谢         | 2289428 | 2401683 | 3334329 | 2917877 | 2318784 |
| 功能未知               | 2313125 | 2440545 | 3184462 | 2715297 | 2213262 |
| 氨基酸转运和代谢           | 2301019 | 2431784 | 3159991 | 2709198 | 2063879 |
| 仅一般功能预测            | 2274291 | 2305328 | 2997701 | 2597727 | 2013570 |
| 转录                 | 2276352 | 2224456 | 2996151 | 2595878 | 1947487 |
| 复制、重组和修复           | 2107192 | 2178353 | 2782416 | 2434205 | 1828655 |
| 翻译、核糖体结构和生物发生      | 1912017 | 1996941 | 2574373 | 2228762 | 1762757 |
| 细胞壁/膜/包膜生物发生       | 1789223 | 1747158 | 2360297 | 2043270 | 1625451 |
| 能量产生和转化            | 1707675 | 1659106 | 2187271 | 1850800 | 1425915 |
| 无机离子转运和代谢          | 1527143 | 1518213 | 2007923 | 1758339 | 1398860 |
| 信号转导机制             | 1547349 | 1444707 | 2101724 | 1775690 | 1262364 |
| 辅酶转运和代谢            | 941140  | 928974  | 1275955 | 1091071 | 835326  |
| 核苷酸转运和代谢           | 862868  | 951770  | 1217486 | 1053422 | 851281  |
| 防御机制               | 893717  | 899282  | 1239986 | 1084994 | 779317  |
| 翻译后修饰、蛋白质转换、分子伴侣   | 899782  | 905021  | 1155008 | 975280  | 787224  |
| 脂质转运和代谢            | 691367  | 669508  | 893735  | 764362  | 612438  |
| 细胞周期控制、细胞分裂、染色体分配  | 437374  | 438320  | 592478  | 501852  | 366586  |
| 细胞内转运、分泌和囊泡转运      | 378510  | 405940  | 448377  | 385923  | 351942  |
| 次级代谢物的生物合成、转运和分解代谢 | 229419  | 222522  | 266856  | 223290  | 190365  |
| 细胞运动               | 261832  | 246571  | 195994  | 175719  | 170488  |
| 细胞骨架               | 4159    | 2207    | 2224    | 1477    | 1270    |
| RNA 加工和修饰          | 538     | 2657    | 2457    | 1824    | 1699    |
| 染色质结构和动力学          | 2343    | 812     | 1675    | 1352    | 751     |
| 细胞外结构              | 178     | 1052    | 333     | 305     | 629     |

细胞壁/膜/包膜生物发生, 能量产生和转化等通路。

3.5 各组大鼠肠道菌群与血糖、血脂的关联分析结果

表 6 示, 基于门水平的肠道菌群与血糖、血脂的相关性分析显示, 变形菌门与 INS 和 TC 水平呈显著正相关 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。

4 讨论

中医药防治糖尿病的应用历史已有数千年, 尤其在 T2DM 及其并发症的防控中独具优势<sup>[10-11]</sup>。本课题组在临床中采用病证结合原则<sup>[12]</sup> 诊断和治疗糖尿病, 从脾论治, 通过长期临床实践创制益糖康方。该方体现了中医辨证论治和整体观的特色, 具有多靶点、系统性、整体调控的特点。临床研究<sup>[13]</sup> 已证明, 益糖康对糖尿病及并发症有较好的防治作用。本研究结果显示, 益糖康可降低 T2DM 模型大鼠血糖, 并调节血脂水平; 同时肠组织病理结果显示, 模型组肠绒毛顶端上皮细胞脱落较多, 而益糖康组对此有显著改善作用。此外, 与空白组比较, 模型组肠道菌群 chao 指数、shannon 指数均显著降低, 而 coverage 指数升高, 表明模型组肠道菌群群落丰度、多样性均显著降低, 覆盖度增加, 提示 T2DM 大鼠肠道菌群发生紊乱; 而二甲双胍组和益糖康组 shannon 指数较模型组显著回调, 提示两药对菌群结构的多样性有显著改善且效果相当。益生菌组较模型组的 coverage 指数回调, 较益糖康组 shannon 指数降低, 提示益生菌可改善菌群的群落覆盖度, 但对于菌群多样性的改善效果弱于益糖康。

本研究结果显示, 与空白组比较, 模型组肠道菌群中放线菌门和变形菌门的丰度显著增加, 拟杆菌门显著降低, 与文献报道<sup>[5-6]</sup> 一致。变形菌门是一类有害细菌, 可作为肠道菌群紊乱的诊断标志物<sup>[14]</sup>, 故这一结果证实 T2DM 大鼠出现了肠道菌群

失调。经各药物干预后, 益糖康显著升高拟杆菌门和疣微菌门丰度, 降低变形菌门丰度, 提示大鼠肠道菌群有回调趋势; 二甲双胍对变形菌门、疣微菌门显现回调作用, 且与益糖康效果相当; 益生菌拟杆菌门、疣微菌门显著升高, 放线菌门、其他菌门显著降低, 说明对大鼠肠道菌群有一定的改善作用。此外, 相关性研究结果显示, 变形菌门与 INS、TC 水平呈现显著正相关, 且本研究结果中可见模型组大鼠变形菌门丰度显著增加, 同时可见与其正相关的 TC 和 INS 水平增加; 而与模型组相比, 益糖康组变形菌门丰度显著降低, 与其正相关的 INS 水平也显著降低。

进一步研究大鼠肠道菌群的属级差异, 寻找具有统计学差异的显著差异物种, 其中益糖康组有 11 个差异菌属, 提示这 11 个菌属可能为本研究的生物标识, 可作为进一步研究的重点关注。此外, 对菌群 (属) COG 功能分类结果表明, 差异菌群显著影响碳水化合物转运和代谢, 氨基酸转运和代谢, 转录, 复制、重组和修复, 翻译、核糖体结构和生物发生, 细胞壁/膜/包膜生物发生, 能量产生和转化等通路, 提示肠道菌群失调可能导致相关功能的差异, 而该差异可能进一步改变肠道环境, 加重肠道菌群失调。

综上, 益糖康能够显著调节 T2DM 模型大鼠的血糖、血脂水平, 显著增加肠道拟杆菌门和疣微菌门丰度, 降低变形菌门丰度; 并且肠道菌群结构和功能的改变与血糖、血脂指标间存在显著相关性。此外, 本研究结果还可同时对益生菌的降糖效果进行评价, 结果显示益生菌能降低 T2DM 大鼠血糖并能调节大鼠肠道菌群结构, 与文献报道<sup>[15-16]</sup> 一致, 可为糖尿病的临床治疗药物开发提供参考。本研究所用样本量可满足测序需求但仍相对不足, 后续研究中将增加样本量, 并将进一步对涉及的相关通路进行研究。

表 6 基于门水平的肠道菌群与血糖、血脂指标相关系数

| 肠道菌群 | 血糖       | INS                   | HbA1c    | TC                    | TG       | HDL-C    | LDL-C    |
|------|----------|-----------------------|----------|-----------------------|----------|----------|----------|
| 厚壁菌门 | -0.04297 | -0.10379              | -0.11394 | -0.28996              | -0.01316 | 0.28172  | 0.09016  |
| 放线菌门 | 0.28712  | 0.27523               | 0.12380  | 0.20558               | -0.00384 | -0.13771 | 0.11099  |
| 拟杆菌门 | -0.28001 | -0.25633              | -0.24514 | -0.20146              | -0.10609 | 0.14045  | -0.15018 |
| 变形菌门 | 0.37361  | 0.37847 <sup>a)</sup> | 0.34922  | 0.58404 <sup>b)</sup> | 0.23821  | -0.28830 | 0.23541  |
| 疣微菌门 | 0.03164  | -0.05125              | 0.06127  | 0.26365               | -0.17750 | 0.04494  | -0.13494 |

注: INS, 胰岛素; HbA1c, 糖化血红蛋白; TG, 甘油三酯; TC, 总胆固醇; HDL-C, 高密度脂蛋白胆固醇; LDL-C, 低密度脂蛋白胆固醇。  
a)  $P<0.05$ ; b)  $P<0.01$ 。

## 参考文献

- [1]中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2020 年版)[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2021, 37(4): 311-398.
- [2]WILLIAMS R, KARURANGA S, MALANDA B, et al. Global and regional estimates and projections of diabetes-related health expenditure: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas. 9th edition [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2020, 162: 108072. doi: 10.1016/j.diabres.2020.108072.
- [3]封慧, 朱欣轶, 王长松. 健脾中药对肠道微生态作用机制研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(10): 137-140.
- [4]王雨珊, 李万丛, 游颖, 等. 中药调节肠道菌群改善人体健康的研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(9): 2203-2209.
- [5]NAVAB-MOGHADAM F, SEDIGHI M, KHAMSEH ME, et al. The association of type II diabetes with gut microbiota composition [J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 110: 630-636. doi: 10.1016/j.micpath.2017.07.034.
- [6]LARSEN N, VOGENSEN FK, BERG FWVAN DEN, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults [J]. PLoS One, 2010, 5(2): e9085.
- [7]王莉, 石岩, 杨宇峰, 等. 中药益糖康治疗痰热互结型并有糖调节受损的代谢综合征临床研究[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(5): 846-848.
- [8]HAN X, YANG Y, METWALY AM, et al. The Chinese herbal formulae (Yitangkang) exerts an antidiabetic effect through the regulation of substance metabolism and energy metabolism in type 2 diabetic rats [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 239: 111942. doi: 10.1016/j.jep.2019.111942.
- [9]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.
- [10]田佳星, 赵林华, 连凤梅, 等. 中医药防治糖尿病研究进展述评[J]. 中医杂志, 2015, 56(24): 2093-2097.
- [11]胡佳卉, 钱会南, 白雪芳, 等. 不同中成药联合二甲双胍治疗 2 型糖尿病有效性的网状 Meta 分析[J]. 中医杂志, 2020, 61(24): 2163-2173.
- [12]中国医师协会中西医结合医师分会内分泌与代谢病专业委员会. 2 型糖尿病病证结合诊疗指南[J]. 中医杂志, 2021, 62(4): 361-368.
- [13]刘鑫, 石岩. 中药复方益糖康治疗脾气虚 2 型糖尿病的临床应用[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(10): 1914-1915.
- [14]刘佳, 夏永军, 熊智强, 等. 益生菌对 2 型糖尿病缓解作用的研究进展[J]. 食品工业科技. (2021-04-27) [2021-08-20]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021010167>.
- [15]张海平, 李微, 李瑞英, 等. 益生菌发酵乳对糖尿病大鼠血糖水平和肠道菌群的影响[J]. 营养学报, 2018, 40(5): 454-458.
- [16]张新霞, 刘万富, 熊冉, 等. 参芪复方对初诊 2 型糖尿病气阴两虚兼血瘀证患者肠道微生态的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(22): 72-77.

## Effects of *Yitangkang* (益糖康) on Regulating Glucose-lipid Metabolism and Intestinal Microflora in Type 2 Diabetes Model Rats

HAN Xueying, SHAN Guoshun, YANG Yufeng, WANG Lingling, DOU Deqiang, YU Jiaxiang, SHI Yan  
Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, 110847

**ABSTRACT Objective** To explore the possible mechanism of *Yitangkang* (益糖康) in the treatment of type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Methods** The model of T2DM was established by high-fat diet and one-time intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ, 45 mg/kg). The successfully-modeled 32 SD rats were randomly divided into model group, *Yitangkang* group, metformin group and probiotics group, with eight rats in each group, while 8 SD rats with ordinary diet were also set as blank group. The *Yitangkang* group was given 56 g/(kg·d) of crude *Yitangkang* by gavage; the metformin group was given 150 mg/(kg·d) of metformin hydrochloride tablets by gavage; the probiotics group was administered with 150 mg/(kg·d) of probiotics granules by gavage, while the blank group and model group were given 0.1 ml/10 g normal saline by gavage, once daily in all groups. After 4 weeks, the pathological morphology of the intestinal tissues were observed through HE staining, and the levels of blood glucose, insulin (INS), glycosylated hemoglobin (HbA1c), total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) were measured; 16S rRNA technology was used to determine the intestinal flora structure of the intestinal content, and  $\alpha$  diversity index analysis, species composition analysis, the linear discriminant analysis effect size (LEfSe) of species differences, and the COG function annotation were performed;

the correlations between the differential intestinal flora and blood sugar and blood lipids were analyzed. **Results** Pathological results showed that a large number of epithelial cells were shed from the apical intestinal villi in the model group and the probiotics group; inflammatory cell focal infiltration was occasionally seen in the metformin group; the shed epithelial cells of the apical intestinal villi of the *Yitangkang* group were significantly reduced compared to those of the model group. Compared to those of the blank group, the levels of blood glucose, INS, HbA1c, TC, TG and LDL-C and the coverage index of the model group significantly increased, and the HDL-C level, the shannon index and chao index were all significantly reduced; the abundance of Actinomycota and Proteobacteria significantly increased, while the abundance of Bacteroides significantly decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Compared to those of the model group, the levels of blood glucose, INS, HbA1c, TG and LDL-C in the metformin group and *Yitangkang* group were significantly reduced, and the HDL-C level and the shannon index significantly increased; the blood sugar and coverage index of the probiotics group decreased; the Proteobacteria abundance of the metformin group was significantly reduced, and the Verrucomicrobia abundance significantly increased; the Bacteroides and Verrucomicrobia of the *Yitangkang* group significantly increased, and the Proteobacteria significantly decreased; the Bacteroides and Verrucomicrobia of the probiotics group significantly increased, while the Actinomycota and other bacteria were significantly reduced ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). There were no significant differences between the metformin group and *Yitangkang* group in all indicators ( $P > 0.05$ ). Compared to those of *Yitangkang* group, the levels of blood glucose, INS, HbA1c, TG and LDL-C of the probiotics group significantly increased, while the HDL-C level and the shannon index significantly decreased; the abundance of Bacteroides and Proteobacteria significantly increased, while the abundance of Actinomycota and other bacteria were significantly reduced ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). There were 53 differential flora (genus) in the blank group, 8 differential flora (genus) in model group, 13 differential flora (genus) in metformin group, 11 differential flora (genus) in *Yitangkang* group and 5 differential flora (genus) in probiotics group. COG functional classification showed that differential flora significantly affected carbohydrate transport and metabolism, amino acid transport and metabolism, transcription, replication, recombination and repair, ribosomal structure and biogenesis pathways. Proteobacteria was significantly positively correlated with INS and TC levels ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion** *Yitangkang* could regulate glucose and lipid metabolism of T2DM rats, whose effect is equal to metformin and better than probiotics. The mechanism may be related to its function of improving the composition and structure of intestinal flora.

**Keywords** type 2 diabetes mellitus; glucose and lipid metabolism; intestinal flora; *Yitangkang* (益糖康); metformin; probiotics

(收稿日期: 2021-06-30; 修回日期: 2021-09-29)

[编辑: 王利芬]