

杜仲籽油对 2 型糖尿病 KKAY 小鼠糖脂代谢及肠道菌群的影响

武毅楠, 高梦珂, 李攀峰, 薛 柯, 李 钦*

(河南大学药学院, 开封 475004)

摘 要: 目的 探讨杜仲籽油对 2 型糖尿病 KKAY 小鼠糖脂代谢及肠道菌群的影响。**方法** 24 只 KKAY 小鼠随机分为 3 组(模型组、阳性药组、杜仲籽油组), 8 只 C57BL/6J 小鼠为正常组。实验 7 周后测定小鼠体重、空腹血糖和空腹胰岛素、糖耐受量、血脂四项和肝功能两项, 进行肝脏油红 O 染色和小鼠肠道菌群检测。

结果 与模型组相比, 杜仲籽油组降低小鼠空腹血糖、空腹胰岛素、糖耐量曲线下面积、胆固醇和甘油三酯、低密度脂蛋白含量($P < 0.05$), 减轻肝脏脂肪变性, 改善肠道菌群失调, 提高微生物多样性, 降低厚壁菌门(Firmicutes)/拟杆菌门(Bacteroidetes)比例, 升高布劳特氏菌属(*Blautia*)和乳杆菌属(*Lactobacillus*)相对丰度($P < 0.05$), 有降低嗜胆菌属(*Bilophila*)和厌氧棒状菌属(*Anaerostipes*)相对丰度的趋势($P > 0.05$)。**结论** 杜仲籽油对高脂饮食引起的 KKAY 小鼠糖脂代谢及肠道菌群紊乱有一定的调节作用。

关键词: KKAY; 杜仲籽油; 糖脂代谢; 肠道菌群

Effects of *Eucommia ulmoides* seed oil on glycolipid metabolism and gut microbiota in KKAY mice with type 2 diabetes mellitus

WU Yi-Nan, GAO Meng-Ke, LI Pan-Feng, XUE Ke, LI Qin*

(College of Pharmacy, Henan University, Kaifeng 475004, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the effects of *Eucommia ulmoides* seed oil on glycolipid metabolism and gut microbiota in KKAY mice with type 2 diabetes mellitus. **Methods** 24 KKAY mice were randomly divided into 3 groups (model group, positive drug group, *Eucommia ulmoides* seed oil group), and 8 C57BL/6J mice were normal group. After 7 weeks of the experiment, the body weight, fasting blood glucose and fasting insulin, glucose tolerance, 4 items of blood lipids and 2 items of liver function were measured, and the liver oil red O staining and the intestinal flora of the mice were detected. **Results** Compared with the model group, *Eucommia ulmoides* seed oil decreased the content of fasting blood glucose, fasting insulin, glucose tolerance curve area, total cholesterol, total triglyceride and low-density lipoprotein ($P < 0.05$), alleviated liver steatosis, improved intestinal flora imbalance, increased microbial diversity, decreased the ratio of Firmicutes/Bacteroidetes, and increased the relative abundance of *Blautia* and *Lactobacillus* ($P < 0.05$). There was a tendency to decrease the relative abundance of *Cholangiophil* (*Bilophila*) and anaerobic *Corynebacterium* (*Anaerostipes*) ($P > 0.05$). **Conclusion** *Eucommia ulmoides* seed oil has a certain

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFD0600702)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2017YFD0600702)

*通信作者: 李钦, 教授, 主要研究方向为中药新药开发与质量控制。E-mail: liqin6006@163.com

*Corresponding author: LI Qin, Professor, Institute of Materia Medica, School of Pharmacy, Henan University, Kaifeng, Henan 475004, China. E-mail: liqin6006@163.com

regulatory effect on glycolipid metabolism and gut microbiota disorder in KKAY mice fed high fat diet.

KEY WORDS: KKAY; *Eucommia ulmoides* seed oil; glycolipid metabolism; gut microbiota

0 引言

糖尿病是公认的威胁全人类健康的慢性非传染性疾病,因其致残率高、并发症多已成为全球亟需解决的重大公共卫生问题^[1]。截至2019年,中国糖尿病患者规模超1.1亿,占全球总数的近1/4,其中90%以上为2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)患者^[2]。目前,临床上针对T2DM患者的治疗通常采用口服西药或注射胰岛素的方式,但其存在严重的副作用^[3]。因此,从天然植物中寻找和开发活性物质作为功能因子的保健食品,已成为当前糖尿病治疗领域的热点。

肠道菌群由数万亿个微生物组成,在调节机体营养代谢和维持肠道免疫屏障等方面发挥重要作用。新一代高通量测序技术的发展推动了人们对膳食结构与肠道菌群关系的探索,大量研究表明高脂饮食诱导肠道菌群稳态失衡,降低肠屏障完整性,加剧T2DM发展^[4]。肠道菌群的调节作用已成为当前预防和治疗T2DM的潜在新靶点。功能性植物油是指具有特殊功能活性成分的油脂,宿主可以通过补充功能性油脂进行膳食干预,继而维持肠道菌群丰富度和多样性,促进宿主体健康。大量研究表明补充新资源植物油可明显改善糖脂代谢异常。SU等^[5]研究发现补充新资源食品牡丹籽油可明显降低糖尿病小鼠血糖水平和血糖曲线下面积,降低总胆固醇和甘油三酯含量。QU等^[6]研究发现猕猴桃籽油可通过下调坏死因子- α 、白细胞介素-1 β 、白细胞介素-6基因表达调节高脂饮食诱导C57小鼠糖脂代谢异常和肠道菌群紊乱。WANG等^[7]研究发现紫苏油通过上调KKAY小鼠磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶(phosphatidylinositol-3-kinases/protein-serine-threonine kinase, PI3K/Akt)信号通路,延缓糖尿病发展,促进肠道菌群恢复。ZHU等^[8]研究发现亚麻籽油通过促进T2DM大鼠体内拟杆菌和另枝菌的生长,抑制厚壁菌和布劳氏氏菌的生长,改善血脂代谢,缓解肠道菌群紊乱。YU等^[9]研究发现紫苏油和鱼油可降低非酒精性肝病大鼠体内普氏菌相对丰度。2016年国际科学协会将饱和脂肪酸纳入益生元中^[10],补充饱和脂肪酸已成为T2DM营养干预研究的热点。

杜仲籽油、紫苏籽油、牡丹籽油、亚麻籽油和花生油、大豆油、菜籽油是市面上几种常见的植物油,其中杜仲籽油、紫苏籽油、牡丹籽油和亚麻籽油等新资源食品油中多不饱和脂肪酸含量更高,主要以亚麻酸和亚油酸为主,而饱和脂肪酸含量明显低于花生油、大豆油、菜籽油等居民食用油^[11]。新资源食品油在脂肪酸组成和抗氧化能力方面,

都有其独特的优势,人体必需不饱和脂肪酸含量超过其他食用油,极具食用和保健价值^[12]。杜仲籽油是一种新资源植物油,含有多种功能性营养成分,如生育酚、多酚、植物甾醇和其他微量成分等,营养价值高。根据SHI^[13]研究可知杜仲籽油含有铁(19.60~63.41 $\mu\text{g/g}$)、锌(22.69~30.48 $\mu\text{g/g}$)、铜(10.11~21.82 $\mu\text{g/g}$)等微量元素和钠(200.17~264.68 $\mu\text{g/g}$)、镁(28.17~63.41 $\mu\text{g/g}$)等常量元素,并且杜仲籽油中含有4032.38~5169.57 mg/kg植物甾醇和1078.33~1424.44 mg/kg的生育酚。植物甾醇属于天然活性物质,具有降血脂、抗炎、抗氧化等功效^[14-15],生育酚和多酚是种子油中重要的天然抗氧化剂^[16],具有清除活性氧的作用。微量元素在促进人体生长发育过程中起着重要作用^[17]。并且杜仲籽油富含多种不饱和脂肪酸,其中亚麻酸是脂肪酸代谢中重要的调节因子,能够抑制脂肪合成,促进脂肪分解,具有降低血脂、保护心脑血管、对高血压、心脏病、糖尿病以及肥胖等有积极的防治作用^[18-20]。杜仲籽油具有保护肝脏、抗炎、抗氧化、降血脂等功能^[21],但是杜仲籽油对T2DM的影响作用并不明确。因此,本研究立足于杜仲产业深加工及保健食品产业发展要求,采用高脂饮食诱导KKAY小鼠模型,通过对糖脂代谢相关指标、肝脏病理切片和肠道菌群的分析,探究杜仲籽油对小鼠糖脂代谢的影响,为进一步加大杜仲资源综合应用,提高杜仲产业附加值,发展杜仲保健食品产业提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料及动物

杜仲籽油(国家林业局泡桐研究开发中心);罗格列酮片(成都恒瑞制药有限公司);无水葡萄糖(99.9%,西安天正药用辅料有限公司);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)试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)试剂盒、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)试剂盒、谷丙转氨酶(alanine aminotransaminase, ALT)试剂盒(南京建成生物工程研究所);小鼠胰岛素酶联免疫吸附试剂盒(睿信生物科技有限公司)。

无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级雄性8周龄KKAY小鼠[北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证号:SCXK(京)2019-0008];同周龄SPF级雄性C57BL/6J小鼠[河南斯克贝斯生物科技股份有限公司,许可证号:SCXK(豫)2020-0005];高脂饲料、基础饲料[河南环宇禾康生物科技股份有限公司,许可证号:SCXK(豫)2020-0004]。

1.2 仪器与设备

Multiskan MK3 全波长酶标仪、D1524R 低温高速离心机(美国 Thermo 公司); CHB902 电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司); RM2153 切片机(德国 LEICA 公司); Illumina Miseq 高通量测序仪(美国 Illumina 公司); 悦准 I 型(710)血糖仪、血糖试纸(江苏鱼跃有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 动物分组及给药

C57BL/6J 小鼠给予基础饲料喂养, KKAY 小鼠给予高脂饲料喂养。2 周后, 尾尖采血将空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)大于 7.0 mmol/L 的 KKAY 小鼠和血糖正常的 C57BL/6J 小鼠入组, 每组 8 只。C57BL/6J 小鼠为正常组(control), 按小鼠空腹血糖将 KKAY 小鼠随机分为模型组(model)、阳性药组(rosiglitazone tablets)、杜仲籽油组(*Eucommia seed oil*)。采取灌胃方式进行干预, 剂量依据《药理实验方法学》中“标准体重动物剂量换算表”来确定, 具体分组及给药情况见表 1。0.1 mL/10 g 体质量, 连续灌胃 7 周。

表 1 实验小鼠分组及给药情况
Table 1 Grouping and administration of experimental mice

组别	剂量	饲料
正常组	0.9%生理盐水	基础饲料
模型组	0.9%生理盐水	高脂饲料
阳性药组	0.6 mg/kg 罗格列酮	高脂饲料
杜仲籽油组	0.9 mg/g 杜仲籽油	高脂饲料

1.3.2 小鼠口服葡萄糖耐量实验和血清生化指标检测

解剖前一周, 每组取 6 只小鼠以 2 g/kg 的剂量灌胃 20%葡萄糖溶液进行口服葡萄糖耐量实验^[22](oral glucose tolerance test, OGTT)。干预 7 周后禁食不禁水 12 h, 尾尖取血检测空腹血糖, 次日进行解剖。小鼠乙醚吸入麻醉后, 脱颈处死。眼球采血, 4℃、3000 r/min 离心 15 min 分离出血清, 用于检测。小鼠血清中 TC、TG、LDL-C、HDL-C、AST、ALT 和空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)含量测定方

法严格按照试剂盒操作说明进行。

1.3.3 小鼠肝脏冰冻切片油红 O 染色

小鼠解剖后, 取出肝脏用生理盐水冲洗, 4%多聚甲醛固定后进行油红 O 染色, 使用 Image Pro Plus 6.0 对肝脏脂滴面积进行处理分析, 肝脏脂滴面积率/%=100%×肝脏中脂滴面积/肝脏切片总面积。

1.3.4 小鼠肠道菌群测定

采用腹部挤压法用无菌冻存管收集小鼠新鲜粪便, 后续进行肠道菌群分析。PCR 扩增及高通量测序技术委托上海欧易生物技术股份有限公司完成。

1.3.5 数据统计分析

实验数据采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析处理, 用 Graphpad Prism 8 进行数据做图, 计量资料均用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析和 *T* 检验, 用 *P*<0.05 表示有显著统计学差异。

2 结果与分析

2.1 杜仲籽油对小鼠糖代谢的影响

长期高脂饮食导致 KKAY 小鼠出现明显的糖代谢紊乱情况, 监测小鼠体重、FBG 和空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)水平。与正常组比较, 模型组的空腹血糖、体重、胰岛素含量显著升高(*P*<0.05)。与模型组相比, 阳性药组小鼠 FBG 和 FINS 水平降低了 32.36%、37.65% (*P*<0.05), 杜仲籽油组小鼠 FBG 和 FINS 水平降低了 24.23%、10.16% (*P*<0.05)。模型组与正常组小鼠体重有显著差异(*P*<0.05)。与模型组相比, 阳性药和杜仲籽油干预后体重有下降趋势但无显著性差异(*P*>0.05), 表明二者对小鼠肥胖有一定的改善作用。如表 2 所示。

小鼠口服葡萄糖耐量曲线以及糖耐量曲线下面积(area under the curve, AUC)如图 1(a、b)所示。与正常组相比, 模型组与阳性药、杜仲籽油组小鼠在灌胃葡萄糖后, AUC 面积显著升高(*P*<0.05), 与模型组相比, 阳性药组 AUC 面积降低了 22.15% (*P*<0.05), 杜仲籽油组 AUC 面积降低了 15.20% (*P*<0.05), 阳性药和杜仲籽油干预可明显改善小鼠糖代谢紊乱, 阳性药组对糖代谢紊乱改善作用更显著。

表 2 杜仲籽油对小鼠空腹血糖、体重和空腹胰岛素水平的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)
Table 2 Effects of *Eucommia ulmoides* seed oil on FBG, body weight and FINS levels in mice($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	空腹胰岛素/(mIU/L)	空腹血糖/(mmol/L)		体重/g	
		入组血糖	最终血糖	入组体重	最终体重
正常组	6.42±0.47*	4.78±0.72*	5.90±1.26*	19.43±1.52*	24.10±1.03*
模型组	16.44±0.77#	7.95±0.66#	11.68±1.83#	37.80±0.72#	42.30±2.29#
阳性药组	10.25±2.05**	7.70±0.32#	7.90±1.16**	38.62±1.03#	41.45±2.00#
杜仲籽油组	14.77±0.96**	7.89±0.54#	8.85±3.06**	37.81±2.41#	40.81±1.33#

注: *表示与正常组比较 *P*<0.05, #表示与模型组比较 *P*<0.05, 以下同。

2.2 杜仲籽油对小鼠血脂和肝功能的影响

高脂饮食导致 TG 与 TC 的含量显著升高, 诱导脂质堆积, 加剧高血脂症、糖尿病发生^[23]。HDL-C 被认为是“血管清道夫”, 将血液中游离的胆固醇运至肝脏进行代谢, 阻止动脉粥样硬化的发生^[24]。而 LDL-C 将肝脏中胆固醇运到血液及外围组织, 增加心血管疾病的发病率^[25], 使 TG 在肝脏中大量堆积, 进而形成脂肪肝。ALT 和 AST 主要存在于肝脏中, 一旦肝细胞受损, 血清中 AST 和 ALT 活力异常升高, 二者是诊断肝功能并反映肝脏损伤程度的重要指标^[25]。

由表 3 可知, 与正常组相比, 模型组 TG、TC、LDL-C、AST 水平显著升高($P<0.05$)。与模型组相比, 阳性药组 TG、TC、LDL-C、AST 含量分别降低了 46.01%、53.06%、62.26%、33.21% ($P<0.05$)。杜仲籽油组 TG、TC、LDL-C、AST 含量分别降低了 38.02%、61.85%、65.41%、34.63% ($P<0.05$)。表明阳性药和杜仲籽油干预可明显改善小鼠脂代谢紊乱和肝功能受损, 杜仲籽油组对脂代谢紊乱改善作用更显著。

2.3 杜仲籽油对小鼠肝脏组织影响

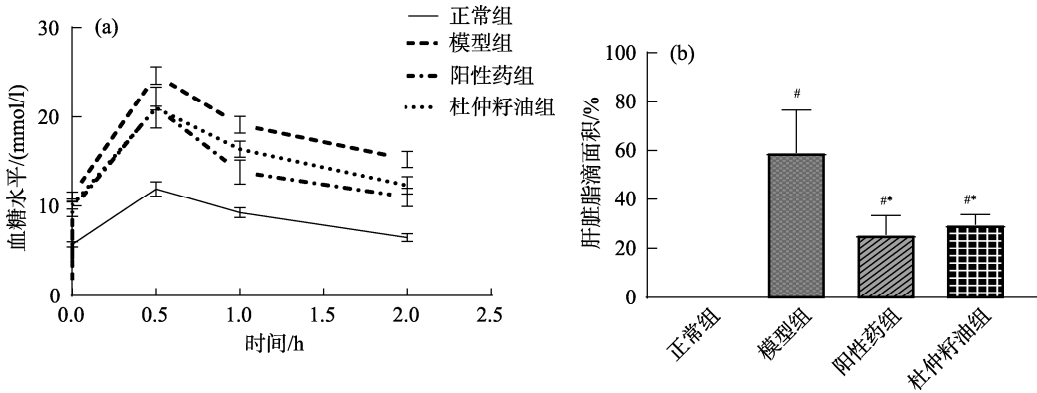
通过观察油红 O 染色切片, 可观察到正常组小鼠肝脏细胞构筑正常、排列有序并未见脂滴形成, 如图 2(a); 模型组小鼠肝脏脂肪空泡化明显, 出现大量脂滴积聚和严重的脂肪变性情况, 如图 2(b)。在 RGZ

和 MEUO 干预组中, 肝脏组织切片中脂肪变性情况明显减轻, 如图 2(c、d)。通过 Image Pro Plus 6.0 对肝脏脂滴面积进行处理分析发现, 阳性药和杜仲籽油干预组中脂滴积聚面积分别降低了 56.92%、49.85% ($P<0.05$), 如图 3。综上, 阳性药和杜仲籽油干预能明显改善高脂饮食导致的 KKAY 小鼠肝脏脂肪性病变。

2.4 多样性分析

2.4.1 Alpha 多样性分析

肠道菌群 Alpha 多样性可反映微生物群落的丰富度和多样性。由表 4 可知, 4 组的 Coverage 指数值均为 0.99, 说明测序深度合理。OTUs (Operational Taxonomic Units) 代表肠道菌群的一类相似微生物的集合, 根据 OTUs 聚类结果, 可得到对应的物种信息和基于物种的丰度分布情况。OTUs 值越大, 菌种数量和种类越多, 阳性药和杜仲籽油组菌群多样性均高于模型组($P<0.05$)。Chao1 指数反映样品群落中物种的数量, Chao1 值越大, 菌群数越多, 杜仲籽油组和阳性药组菌群多样性均高于模型组。香农指数和辛普森指数反映样品群落丰富度和均匀度。香农指数值越大, 菌群多样性越高, 模型组香农指数值最小, 杜仲籽油组和阳性药组菌群多样性均高于模型组。辛普森指数值越大, 菌群多样性越低, 4 个组的辛普森指数值无显著性差异。综上, 高脂饮食降低 KKAY 小鼠肠道菌群丰度和多样性, 而阳性药和杜仲籽油干预后肠道菌群的丰度和多样性得到改善。



注: #表示与正常组比较 $P<0.05$, *表示与模型组比较 $P<0.05$, 图 3、5、6 相同。

图 1 口服葡萄糖耐量实验结果($n=6$)

Fig.1 Results of oral glucose tolerance test ($n=6$)

表 3 杜仲籽油对小鼠血脂和肝功能的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Effects of *Eucommia ulmoides* seed oil on blood lipids and liver function in mice ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	TG/(mmol/L)	TC/(mmol/L)	LDL-C/(mmol/L)	HDL-C/(mmol/L)	ALT/(U/L)	AST/(U/L)
正常组	1.04±0.18*	4.20±0.51*	0.45±0.06*	4.60±0.84	41.43±4.04	35.70±8.27*
模型组	2.63±0.22 [#]	6.71±0.38 [#]	1.59±0.34 [#]	4.67±0.45	42.04±6.74	57.40±12.25 [#]
阳性药组	1.42±0.17 ^{**}	3.15±0.22 ^{**}	0.60±0.25*	3.92±0.79	47.05±2.84	38.34±9.59*
杜仲籽油组	1.63±0.17 ^{**}	2.56±0.19 ^{**}	0.55±0.09*	5.32±0.88	44.37±5.60	37.53±7.30*

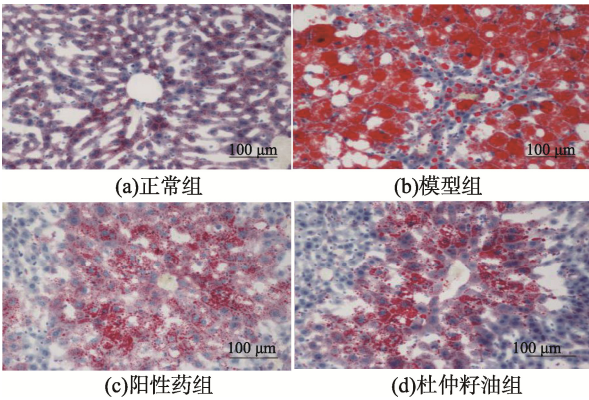


图 2 各组小鼠肝脏切片(油红 O 染色, 200×)
Fig.2 Liver sections of mice in each group
(oil red O staining, 200×)

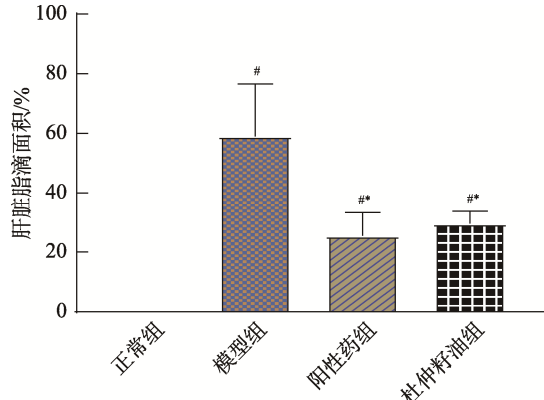


图 3 各组小鼠肝脏脂滴面积(n=3)
Fig.3 Area of lipid droplets in the liver of mice in each group (n=3)

表 4 alpha 多样性比较结果(n=3)
Table 4 Alpha diversity comparison results (n=3)

组别	OTUs	Chao1 指数	香农指数	辛普森指数	Coverage 指数
正常组	1877±199*	2183±183	7.09±0.62	0.96±0.02	0.99±0.00
模型组	1526±91#	1875±64	6.55±0.48	0.96±0.01	0.99±0.00
阳性药组	2078±208*	2455±238*	7.87±1.09*	0.97±0.02	0.99± 0.00
杜仲籽油组	1914±209*	2297±485	7.09±1.23	0.96±0.03	0.99± 0.00

2.4.2 Beta 多样性分析

Beta 多样性分析可反映不同样本菌群间是否存在差异性。非度量多维尺度分析(non-metric multidimensional scaling, NMDS)和主成分分析(principal component analysis, PCA)是目前判断肠道菌群 Beta 多样性的常用方法,能够反映出各组肠道菌群结构间的差异^[26-27]。如图 4 所示,使用 NMDS 分析验证不同组之间的物种多样性差异,正常组和模型组之间发生

明显的分离,阳性药组和杜仲籽油组表现出偏离模型组的趋势。PCA 分析中 PC1 贡献率为 19.49%,PC2 贡献率为 12.78%,可以代表大部分变量信息,是样品菌群结构组成差异的主要因子。模型组与正常组的分布区域较为明显地分开;而阳性药和杜仲籽油组与模型组分布区域基本分开,综上,高脂饮食导致 KKAY 小鼠肠道菌群结构改变,而阳性药和杜仲籽油干预均会对小鼠肠道菌群结构产生影响。

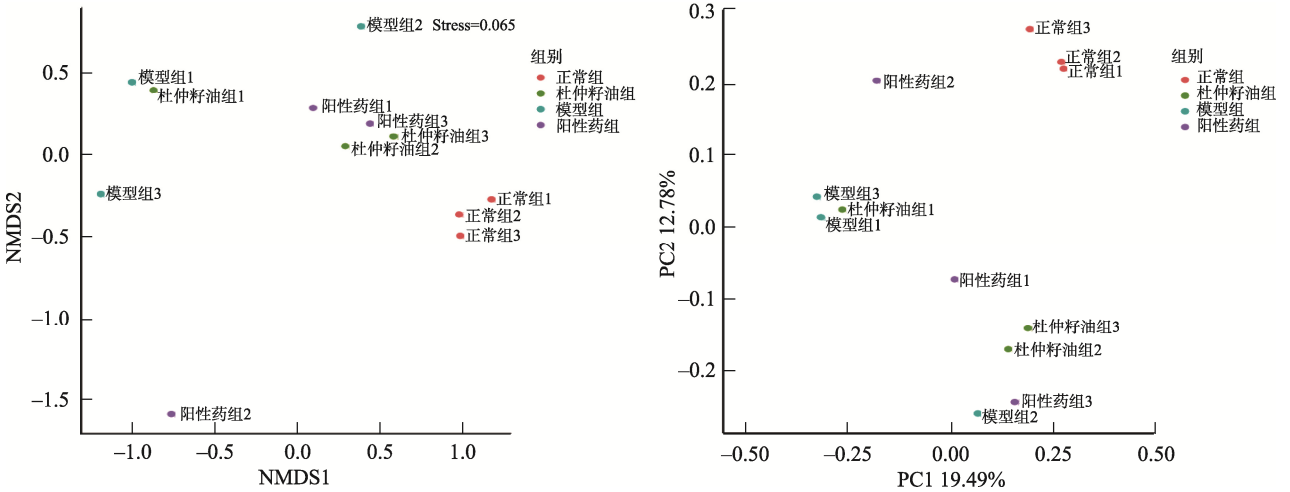


图 4 样本菌群主成分分析
Fig.4 Principal component analysis of sample flora

2.5 菌群构成分析

2.5.1 门水平菌群构成

厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes)是小鼠肠道中主要菌门,其相对丰度变化与 T2DM 有一定相关性。EUGENIA 等^[28]和 QIN 等^[29]的研究表明,厚壁菌门和拟杆菌门二者能共同促进对糖的分解利用^[30],肠道菌群中厚壁菌门/拟杆菌门(Firmicutes/Bacteroidetes, F/B)增大时会导致肥胖,

加剧肠道菌群失调,诱发 2 型糖尿病发生^[31]。比较模型组和各给药组小鼠肠道中厚壁菌门和 F/B 含量,结果如图 5 所示,与模型组比,阳性药和杜仲籽油组小鼠肠道中厚壁菌门含量分别降低了 45.29%、61.51%,而 F/B 的比值分别降低了 0.55 倍、0.77 倍($P<0.05$)。这一结果表明阳性药和杜仲籽油组干预有助于改善高脂饮食引起的 KK_{Ay} 小鼠体内肠道菌群门水平紊乱,抑制 T2DM 对机体带来的危害。

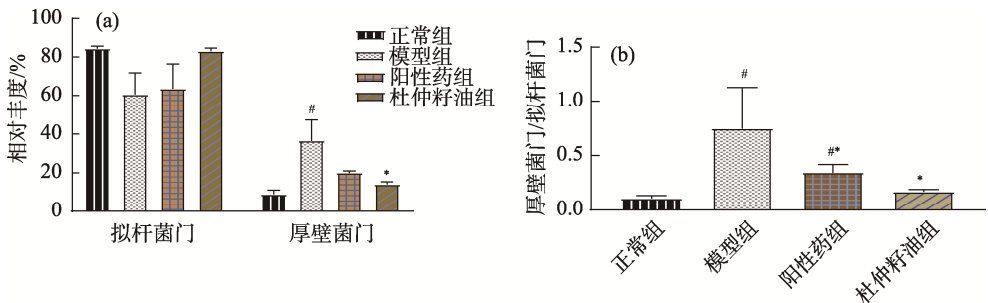


图 5 厚壁菌门和拟杆菌门的相对丰度和比值
Fig.5 Relative abundance and ratio of Streptomyces and Bacteroides

2.5.2 属水平菌群构成

高脂饮食对小鼠肠道内微生物产生影响,从而引起机体的生理变化。研究发现,拟杆菌属(*Bacteroides*)是 T2DM 的独立危险因素,因内毒血症释放炎症因子,降低胰岛素敏感性^[32]。嗜胆菌属(*Bilophila*)在胆汁酸含量丰富的肠道中大量繁殖,加重肠道炎症症状^[33]。厌氧棒状菌属(*Anaerostipes*)可引起机体局部炎症,与 T2DM 炎症水平相关^[33]。毛螺菌科 NK4A136 群(*Lachnospiraceae*_NK4A136_group)可表达超级抗原,进而激活体内的 IgA 应答,修复肠道黏膜损伤,调节肠道稳态^[34]。布劳特氏菌属(*Blautia*)属于乳螺科的一种革兰氏阳性厌氧菌,参与糖代谢紊乱发生过程^[35]。乳杆菌属(*Lactobacillus*)是一类维护肠道健康和调节免疫功能的有益菌属,可有效缓解高血糖水平^[36]。

属水平上的物种相对丰度如图 6 所示。与正常组相比,模型组小鼠拟杆菌属、嗜胆菌属和厌氧棒状菌属相对丰度显著升高($P<0.05$),布劳特氏菌属相对丰度显著下降($P<0.05$),与模型组相比,阳性药组显著下降拟杆菌属和嗜胆菌属相对丰度($P<0.05$),显著升高毛螺菌属 NK4A136 群和乳杆菌属相对丰度($P<0.05$),厌氧棒状菌属和布劳特氏菌属相对丰度有升高的趋势,但无统计学意义。杜仲籽油组显著升高布劳特氏菌属和乳杆菌属相对丰度($P<0.05$),嗜胆菌属和厌氧棒状菌属相对丰度有降低的趋势,但无统计学意义。综上,阳性药和杜仲籽油干预可以降低与炎症发生相关菌属含量,增加肠道有益菌属含量,改善高脂饮食引起的小鼠肠道菌群紊乱。

的基础上转入突变毛色基因(Ay)而形成的,其发病是在遗传易感的基础上加上高脂饮食干预而诱发的^[37],高脂饮食诱导后小鼠会出现明显的肥胖、高血糖、脂质代谢紊乱等症状,因此这种动物模型是广泛应用于研究 T2DM。C57BL/6J 小鼠呈黑色,因与 KK 小鼠具有基因同源性而作为正常对照组^[38]。高血糖是 T2DM 的一个显著特征。GAO 等^[39]将大于 15 mmol/L 的小鼠定义为高血糖。COBAN 等^[40]将空腹血糖水平高于 7 mmol/L 定义为高血糖,而介于 6.1~6.9 mmol/L 之间的值表示空腹血糖受损。以往的研究表明,由于血糖值的标准不同,对高血糖的定义也不同。在本实验中发现,正常组小鼠空腹血糖在 4.2~5.9 mmol/L 之间,而超过 7 mmol/L 的则被定义为糖尿病小鼠。

高脂饮食诱导的肥胖被认为是导致一系列代谢紊乱综合征的主要原因。高脂饮食会导致 KK_{Ay} 小鼠出现明显的肥胖症状,过度脂肪积累引起肝脏脂肪空泡化,肝功能受损,并导致空腹血糖升高,进而导致胰岛素抵抗。在本研究中,长期服用高脂饲料导致 KK_{Ay} 小鼠出现高血糖,联合测定 FBG、OGTT 和 FINS,可以避免单一指标的局限性,有效反映小鼠血糖水平与葡萄糖糖耐量受损情况。实验结果显示,阳性药和杜仲籽油干预可明显缓解小鼠糖代谢紊乱($P<0.05$),改善胰岛素抵抗,阳性药组对糖代谢紊乱改善作用更显著。血脂四项、肝脏油红 O 染色和肝功能两项是评价小鼠肝脏脂质代谢紊乱的重要指标。实验结果显示,阳性药和杜仲籽油干预可明显缓解高脂饮食诱导的 KK_{Ay} 小鼠脂质代谢异常,减少肝组织脂滴含量,杜仲籽油组对脂代谢紊乱改善作用更显著,但对于杜仲籽油对 KK_{Ay} 小鼠糖脂代谢影响的通路机制

3 结论与讨论

本研究选用 KK_{Ay} 小鼠模型, KK_{Ay} 小鼠是在 KK 小鼠

仍有待进一步有研究。

肠道菌群在机体获取营养、消化代谢过程中发挥重要作用,作为关键性因素参与了高脂饮食诱导的肥胖型 T2DM 糖脂代谢紊乱、炎症和肠屏障破坏的发生发展。实验结果显示,与模型组相比,杜仲籽油干预后小鼠厚壁菌门相对丰度降低,拟杆菌门相对丰度升高,与已有文献报道,肥胖或糖尿病患者一般表现为厚壁菌门相对丰度增加,拟杆菌门相对丰度减少, F/B 比值升高,药物干预后则表现为厚壁菌门丰度减少,拟杆菌门丰度增加, F/B 比值降低的结论一致^[41-42]。同时本实验数据显示,与模型组相比,杜仲籽油干预后小鼠布劳特氏菌属和乳杆菌属相对丰度升高。关于文献报道,乳杆菌属丰度的增加,会影响 F/B 的丰度比值进而降低小鼠的血糖水平等机制参与糖脂代谢而产生降糖降脂的作用^[43]。文献报道,拟杆菌属和乳杆菌属可通过释放胆盐水解酶而调节甘氨酸或

牛磺酸以及游离胆汁酸调控脂质代谢的分子机制^[44],这也可能是杜仲籽油调节糖脂代谢的潜在机制。

杜仲籽油灌胃可能通过增加胆汁分泌影响肠道微生物区系。胆汁酸是消化和吸收脂肪的主要影响因素。小鼠灌胃后胆汁酸被释放以溶解脂肪,并被微生物组加工,产生次生代谢物,如短链脂肪酸、三甲胺和次生胆汁酸^[45]。这些次生代谢产物是脂肪-胆汁-肠道连接的关键。此外,杜仲籽油中的亚麻酸还可以通过抑制脂肪酸合成发挥抗菌作用,而脂肪酸合成对细菌的生存和生长至关重要^[46]。但本研究未能深入探讨杜仲籽油进入小鼠体内的次级代谢产物,实验存在局限性,一个时间点肠道菌群的检测不能反映整个实验过程中肠道菌群变化,由于样本量小且缺乏阴性对照组,很难更准确地辨别杜仲籽油对小鼠肠道菌群的作用,这些效应背后的确切机制仍有待进一步研究。

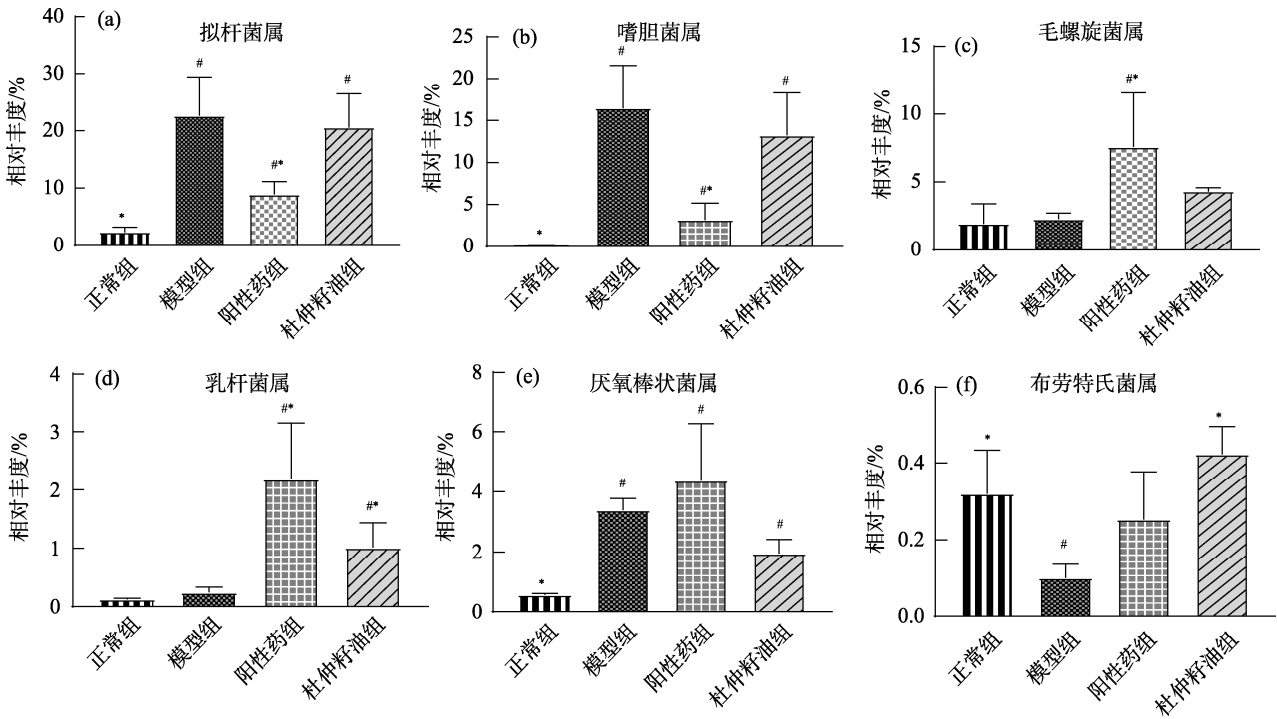


图 6 属水平上的物种相对丰度
Fig.6 Relative abundance of species at the genus level

参考文献

[1] 胡照娟, 张先慧, 张艳红, 等. 辛开苦降方对初发 2 型糖尿病 KKay 小鼠胰岛素敏感性及其脂代谢的影响[J]. 世界中医药, 2014, 9(6): 774-777, 780.
HU ZJ, ZHANG XH, ZHANG YH, et al. Effects of Xinkaikujiang formula on insulin sensitivity and glucolipid metabolism in KKay mice with incipient type 2 diabetes mellitus [J]. World Chin Med, 2014, 9(6): 774-777, 780.

[2] NOLAN CJ, DAMM P. Type 2 diabetes across generations: From pathophysiology to prevention and management [J]. Lancet, 2011, 378: 169-181.

[3] SAGBO II, VENTER MVD, KOEKEMOER T, et al. In vitro antidiabetic activity and mechanism of action of *Brachylaena elliptica* (Thunb.) DC [J]. Evid-based Compl Alter Med: ECAM, 2018, (10): 1-13.

[4] ZHAO L, ZHANG F, DING X, et al. Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes [J]. Science, 2018, 359(6380): 1151-1156.

[5] SU JH, WANG HX, MA CY, et al. Anti-diabetic activity of peony seed oil, a new resource food in STZ-induced diabetic mice [J]. Food Funct, 2015, 6(9): 2930-2938.

[6] QU LL, LIU QQ, ZHANG Q, et al. Kiwifruit seed oil prevents obesity by

- regulating inflammation, thermogenesis and gut microbiota in high-fat diet-induced obese c57bl/6mice [J]. Food Chem Toxicol, 2019, 125: 85–94.
- [7] WANG JK, HE YT, YU DQ, *et al.* Perilla oil regulates intestinal microbiota and alleviates insulin resistance through the PI3K/Akt signaling pathway in type-2 diabetic KKAY mice [J]. Food Chem Toxicol, 2020, 135: 110965.
- [8] ZHU LL, SHA LP, LI K, *et al.* Dietary flaxseed oil rich in omega-3 suppresses severity of type 2 diabetes mellitus via anti-inflammation and modulating gut microbiota in rats [J]. Lipids Health Dis, 2020, 19(1): 20.
- [9] YU T, WANG HL, YUAN FH, *et al.* Perilla oil has similar protective effects of fish oil on high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease and gut dysbiosis [J]. Biomed Res Inter, 2016, 2016: 9462571.
- [10] KIM N, KANG M, NAM M, *et al.* Eicosapentaenoic acid (epa) modulates glucose metabolism by targeting amp-activated protein kinase (AMPK) pathway [J]. Inter J Molecul Sci, 2019, 20(19): 4751.
- [11] 刘颖, 刘晓谦, 梁曜华, 等. 11种植物油的脂肪酸组成与抗氧化活性比较[J]. 中国油脂, 2020, 45(10): 52–56, 61.
- LIU Y, LIU XQ, LIANG YH, *et al.* Comparison of fatty acid compositions and antioxidant activities of eleven vegetable oils [J]. China Oils Fats, 2020, 45(10): 52–56, 61.
- [12] 张小梅, 陆俊杏, 张涛. 4种特色植物油的抗氧化能力和防紫外辐射活性比较[J]. 食品工业, 2020, 41(6): 201–204.
- ZHANG XM, LU JX, ZHANG T. The anti-ultraviolet radiation activities and antioxidant capacity in 4 kinds of vegetable oils [J]. Food Ind, 2020, 41(6): 201–204.
- [13] SHI LK, CHANG M, WANG XQ, *et al.* Physicochemical property, chemical composition and free radical scavenging capacity of cold pressed kernel oils obtained from different *Eucommia ulmoides* oliver cultivars [J]. Ind Crop Prod, 2018, 124: 912–918.
- [14] ROBERT A, MOREAU BD, WHITAKERR KB, *et al.* Phytosterols, and their conjugates in food: Structural diversity, quantitative analysis and health-promoting uses [J]. Prog Lipid Res, 2010, 101: 1471–1476.
- [15] SONG LH, LI YT, QU D, *et al.* The regulatory effects of phytosterol esters (PSEs) on gut flora and faecal metabolites in rats with NAFLD [J]. Food Funct, 2020, 11: 977–991.
- [16] 温运启, 刘玉兰, 王路阳, 等. 不同食用植物油中维生素 E 组分及含量研究[J]. 中国油脂, 2017, 42(3): 35–39.
- WEN YQ, LIU YL, WANG LY, *et al.* Contents and components of vitamin E in different edible vegetable oils [J]. China Oils Fats, 2017, 42(3): 35–39.
- [17] LINDH U. Metal biology: Aspects of beneficial effects [J]. Ambio, 2007, 36(1): 107–110.
- [18] WANG L. $\omega 3$ 和 $\omega 6$ 脂肪酸在体脂增加及肥胖发展中的作用[J]. 中华高血压杂志, 2015, 23(1): 7–14.
- WANG L. $\omega 3$ and $\omega 6$ fatty acids: Role in body fat gain and development of obesity [J]. Chin J Hypert, 2015, 23(1): 7–14.
- [19] 梁媛, 赵馨怡, 张靖伟, 等. 亚油酸和 α -亚麻酸对脂肪干细胞活力及成脂分化的影响[J]. 大连工业大学学报, 2017, 36(5): 321–324.
- LIANG Y, ZHAO XY, ZHANG JW, *et al.* Effect of linoleic acid and alpha-linolenic acid on cell viability and adipogenic differentiation in adipose tissue-derived stromal cell [J]. J Dalian Polytech Univ, 2017, 36(5): 321–324.
- [20] VEDIN I, CEDERHOLM T, FREUND-LEVI Y, *et al.* Effects of DHA-rich n-3 fatty acid supplementation on gene expression in blood mononuclear leukocytes: The Omega study [J]. US Library Med Nat Inst Health, 2012, 7(4): e35425.
- [21] 王宏涛, 卫聪, 苏鹏, 等. 杜仲油软胶囊对模型大鼠血脂水平的调节作用[J]. 中国药业, 2019, 28(16): 20–22.
- WANG HT, WEI C, SU P, *et al.* Effect of *Eucommia ulmoides* oliver oil soft capsules on regulating the level of blood lipid in model rats [J]. China Pharm, 2019, 28(16): 20–22.
- [22] 牛佳卉, 付梦琪, 周茜, 等. 亚麻籽油对链脲佐菌素诱导大鼠糖尿病肾病的保护作用[J]. 食品科学, 2020, 41(3): 120–126.
- NIU JH, FU MQ, ZHOU Q, *et al.* Protective effect of flaxseed oil on diabetic nephropathy induced by streptozocin in rats [J]. Food Sci, 2020, 41(3): 120–126.
- [23] 赵斌, 刘震, 陈平安, 等. 高密度脂蛋白胆固醇和冠心病患者非狭窄冠状动脉微循环阻力的关系[J]. 解剖学研究, 2021, 43(2): 138–142.
- ZHAO B, LIU Z, CHEN PAN, *et al.* Relationship between high density lipoprotein cholesterol and coronary microcirculation resistance of non-constricted coronary arteries in patients with coronary heart disease [J]. Anatomy Res, 2021, 43(2): 138–142.
- [24] HUSEYIN N, DIAS S, ADES AE. Industry sponsorship bias in research findings: A network meta-analysis of ldl cholesterol reduction in randomised trials of statins [J]. BMJ: British Med J, 2014, 349(31): 574–581.
- [25] ZHU KX, NIE SP, TAN LH, *et al.* A polysaccharide from ganoderma atrum improves liver function in type 2 diabetic rats via antioxidant action and short-chain fatty acids excretion [J]. J Agric Food Chem, 2016, 64(9): 1938–1944.
- [26] ZHANG JY, CHEN MX, SUI QW, *et al.* Impacts of addition of natural zeolite or a nitrification inhibitor on antibiotic resistance genes during sludge composting [J]. Water Res, 2016, 91: 339–349.
- [27] GLASL B, HERNDL GJ, FRADE PR. The microbiome of coral surface mucus has a key role in mediating holobiont health and survival upon disturbance [J]. ISME J, 2016, 10(9): 2280–2292.
- [28] EUGENIA B, ARSENIS T, GJALT W. Microbiota profile in feces of breast and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (fish) [J]. Anaerobe, 2011, 17(6): 478–482.
- [29] QIN JJ, LI RQ, RAES J, *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing [J]. Nature, 2010, 464(7285): 59–65.
- [30] 刘尔卓, 吴忠坤, 赵紫薇, 等. 基于高通量测序分析鲜核桃水提液对于小鼠肠道菌群及免疫指标的影响[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(10): 28–33, 166.
- LIU ERZ, WU ZK, ZHAO ZW, *et al.* High-throughput sequencing analysis of fresh areca nut extract on intestinal flora and immune indexes of mice [J]. Food Res Dev, 2020, 41(10): 28–33, 166.
- [31] 周兴婷, 于雷雷, 翟齐喲, 等. 益生菌复配富铬酵母缓解2型糖尿病的作用机制涉及调节肠道菌群失调[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(23): 29–36.
- ZHOU XT, YU LL, ZHAI QX, *et al.* Antidiabetic effects of probiotics compounded with chromium-rich yeast alleviate type 2 diabetes symptoms via regulating gut microbiota imbalance [J]. Food Ferment Ind, 2019, 45(23): 29–36.
- [32] 王佳佳. 拟杆菌属肠型与2型糖尿病发生发展的关系研究[D]. 济南: 山东大学, 2020.
- WANG JJ. Enterotype bacteroides is associated with a high risk in patients with type 2 diabetes [D]. Jinan: University of Shandong, 2020.
- [33] JIAN C, LUUKKONEN P, SDEVIRTA S, *et al.* Impact of short-term overfeeding of saturated or unsaturated fat or sugars on the gut microbiota in relation to liver fat in obese and overweight adults [J]. Clin Nutr, 2021, 40(1): 207–216.
- [34] BUNKER JJ, DREES C, WATSON AR, *et al.* B cell superantigens in the human intestinal microbiota [J]. Sci Translat Med, 2019, 11(507): 9356.

- [35] KASHTANOVA DA, TKACHEVA ON, DOUDINSKAYA EN, *et al.* Gut microbiota in patients with different metabolic statuses: Moscow study [J]. Microorganisms, 2018. DOI: 10.3390/microorganisms6040098
- [36] WANG G, LI XF, ZHAO JX, *et al.* *Lactobacillus casei* ccfm419 attenuates type 2 diabetes via a gut microbiota dependent mechanism [J]. Food Funct, 2017, 8(9): 3155–3164.
- [37] CHEN R, LIANG FX, MORIMOTO S, *et al.* The effects of a PPAR- α agonist on myocardial damage in obese diabetic mice with heart failure [J]. Inter Heart J, 2010, 51(3): 199–206.
- [38] KHAN AH, CAPILLA E, HOU JC, *et al.* Entry of newly synthesized GLUT4 into the insulin-responsive storage compartment is dependent upon both the amino terminus and the large cytoplasmic loop [J]. J Biol Chem, 2004, 279(36): 37505–37511.
- [39] GAO Y, ZHANG M, WU T, *et al.* Effects of d-pinitol on insulin resistance through the PI3K/Akt signaling pathway in type 2 diabetes mellitus rats [J]. Agric Food Chem, 2015, 63: 6019–6026.
- [40] COBAN E, SARI R, OZDOGAN M, *et al.* Levels of plasma fibrinogen and d-dimer in patients with impaired fasting glucose [J]. Exp Clin Endocrinol Diabet, 2005, 113: 35–37.
- [41] 李丽莎, 徐小妹, 卢雪花, 等. 泽泻对高脂高糖饮食大鼠肠道菌群多样性的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2019, 31(4): 396–401.
LI LS, XU XM, LU XH, *et al.* Effects of *Alisma orientale* on the diversity of gut microbiota in rats fed on high-fat and high-sugar diet [J]. Chin J Microecol, 2019, 31(4): 396–401.
- [42] 王少平, 姜珊, 赵一慕, 等. 土鳖虫生物活性肽对高脂血症大鼠肠道菌群调节作用研究[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(5): 621–626.
WANG SP, JIANG S, ZHAO YM, *et al.* Effect of active peptides of *Eupolyphaga* on intestinal flora in rats with hyperlipemia [J]. Chin Pharmacol Bull, 2020, 36(5): 621–626.
- [43] 印伯星, 李艳, 瞿恒贤, 等. 不同乳酸菌发酵乳对高血脂症大鼠肠道菌群的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2019, 55(6): 100–106.
- YIN BX, LI Y, ZAI HX, *et al.* Effects of different lactic acid bacteria fermented milk on intestinal flora of hyperlipidemic rats [J]. Chin J Anim Sci, 2019, 55(6): 100–106.
- [44] 陈春秀. 肠道菌群次级胆汁酸通过调节食欲信号肽对高脂饮食性肥胖的影响[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2020.
CHEN CX. Effect of secondary bile acid of intestinal flora on obesity induced by high-fat diet by regulating appetite signal peptide [D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2020.
- [45] CHEVRE R, SILVESTRE-ROIG C, SOEHNLEIN O. Nutritional modulation of innate immunity: The fat-bile-gut connection [J]. Trends Endocrinol Metab, 2018, 29: 686–698.
- [46] SADO-KAMDEM SL, VANNINI L, GUERZONI ME. Effect of alpha-linolenic, capric and lauric acid on the fatty acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus* [J]. Int J Food Microbiol, 2009, 129: 288–294.

(责任编辑: 韩晓红 郑 丽)

作者简介



武毅楠, 硕士研究生, 主要研究方向为中药药理学。
E-mail: w1287457895@163.com



李 钦, 教授, 主要研究方向为中药新药开发与质量控制。
E-mail: liqin6006@163.com