

黄芪对自然衰老小鼠肠道功能及菌群稳态的作用研究

尹佳婷, 杨淑惠, 李成曦, 刘云, 王雨萌, 段金彪, 郭建明*

(南京中医药大学, 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏南京 210023)

摘要: 伴随着衰老的进程, 机体内多个组织、器官功能发生退行性改变。肠道功能失调及菌群稳态失衡是老年人常见表现。本研究旨在探讨黄芪对自然衰老小鼠肠道功能及菌群稳态的影响, 为进一步的抗衰老机制研究提供依据。采用自然衰老小鼠模型, 动物实验遵循南京中医药大学动物伦理委员会规定。首先采用“虚弱指数”综合评分对小鼠衰老表型进行整体评价。检测小鼠肠道葡萄糖吸收能力、肠道运输时间、肠道脂肪酶以及淀粉酶的活性, 评估肠道吸收和运输功能, 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测结肠炎症因子水平, 苏木精-伊红 (H&E) 染色评价肠道绒毛长度, 阿立新蓝 (AB) 染色评价肠道黏膜厚度及杯状细胞数量, 利用 qRT-PCR 方法检测肠道干细胞增殖与分化相关基因的转录水平, 16S rDNA 测序分析肠道菌群组成。结果显示, 在衰老整体表型方面, 黄芪具有降低衰老小鼠“虚弱指数”的趋势, 但并没有显著性差异。在衰老表型的某些指标上, 黄芪对衰老小鼠毛发以及体能的改善作用最为显著。在肠道功能方面, 黄芪可增加衰老小鼠肠道葡萄糖吸收能力, 缩短肠道运输时间, 促进脂肪酶分泌。黄芪可降低衰老小鼠肠道组织中炎症因子如肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素 6 (IL-6) 水平; 增加小肠绒毛长度、结肠黏膜厚度以及杯状细胞数量, 促进肠干细胞的增殖与分化, 改善肠道屏障功能。此外, 黄芪能增加小鼠肠道菌群多样性, 恢复肠道菌群稳态, 恢复毛螺菌科等多种细菌的丰度。上述研究结果提示, 黄芪可改善自然衰老小鼠的某些表型, 对小鼠肠道功能及菌群稳态的改善作用尤其显著。

关键词: 自然衰老小鼠; 肠道衰老; 肠道功能; 肠道菌群; 黄芪

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)12-3535-11

The effect of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. on intestinal function and gut microbiota homeostasis in aging mice

YIN Jia-ting, YANG Shu-hui, LI Cheng-xi, LIU Yun, WANG Yu-meng,
DUAN Jin-ao, GUO Jian-ming*

(Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources, Nanjing University of Chinese Medicine,
Nanjing 210023, China)

Abstract: Aging can cause degenerative changes in the function of multiple tissues and organs in the body. Gastrointestinal diseases and intestinal dysfunction are very common in the elderly people. The purpose of this study is to explore the effect of the total extract of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. on intestinal function and gut microbiota homeostasis in natural aging mice, which will provide clues for further mechanism study. The natural aging mice model is established and animal experiments follow the regulations of the Animal Ethics Committee of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine. The overall health of the mice was evaluated by the "frailty index" scoring method. The intestinal absorption and transport function were measured by detecting intestinal glucose absorption capacity, transport time, lipase and amylase activities of aging mice. Intestinal inflammation was assessed by detecting inflammatory cytokines by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

收稿日期: 2021-10-08; 修回日期: 2021-11-05.

*通讯作者 Tel: 86-25-85811917, E-mail: njuguo@njucm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1459

The pathological changes in the intestines of aging mice were tested by hematoxylin-eosin (H&E) staining and alizarin blue (AB) staining. The qRT-PCR method was used to explore the gene transcription level related with the proliferation and differentiation of intestinal stem cells. Microbiota analysis based on 16S rDNA were used to evaluate the composition of gut microbiota. The results showed that *Astragalus* had a tendency to reduce the "frailty index" of aging mice, but did not show a significant difference. In some indicators of aging phenotype, *Astragalus* has the most significant effect on hair loss and physical fitness. In terms of intestinal function, *Astragalus* could increase intestinal glucose absorption capacity, shorten intestinal transportation time and promote lipase secretion in aging mice. The levels of inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the aging intestinal tissue were reduced after *Astragalus* administration. *Astragalus* also ameliorated the pathological degeneration of the intestinal tissue of aging mice by increasing the length of small intestinal villi, the thickness of colonic mucosa and goblet cell number. In addition, *Astragalus* elevated the expression of genes associated with the proliferation and differentiation in jejunum and modulated gut microbiota, especially restoring the abundance of Lachnospiraceae. Taken together, the above research results demonstrate the total extract of *Astragalus* as a key factor improving the intestinal function and gut microbiota homeostasis of aging mice.

Key words: aging mouse; intestinal aging; intestinal function; gut microbiota; *Astragalus*

目前,全世界老年人口的比例正在迅速增长。据估计,到2050年,世界老年人口(60岁及以上)的比例将从2013年的8.41亿增加到20亿,占世界人口的21%^[1]。中国第7次人口普查结果显示,60岁及以上人口占全国人口的18.7%,相比2010年上升5.44%,人口老龄化程度进一步加深,将给我国的医疗体系带来沉重的压力和严峻的挑战。

衰老是生命体在增龄过程中发生的退行性变化,随着时间推移,机体细胞、组织、器官功能均会逐渐衰退。神经系统衰退、心血管老化、胃肠道功能紊乱而引发的疾病是最常见的衰老相关疾病,危害着全人类的健康。目前,临床上常用的抗衰老药物主要包括化学药物、生物药物等,化学药物包括哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)抑制剂、二甲双胍和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)增强剂等^[2]。但是长期服用会存在明显的不良反应且有些药物价格昂贵。因此,对延缓衰老药物的研究与开发是国内外学术界及产业界持续关注的热点。

1908年,诺贝尔奖得主、益生菌专家梅契尼科夫在《长寿》一书中写道:“衰老始于肠道”^[3]。肠道由于其免疫和营养摄入的功能,被认为是调节机体延长寿命的重要器官。衰老可导致肠道稳态失衡,具体表现为小肠消化及吸收功能减退、肠运动功能减弱^[4]、消化酶分泌不足^[5]、炎症水平增加^[6]、组织退行性变化、肠干细胞(intestine stem cell, ISC)新生分化功能衰退^[7]和肠道菌群紊乱^[8]等。因此,恢复肠道稳态,延缓衰老进程,改善老年人群的生活质量,具有重要的意义。

黄芪是最常用的“扶正固本,补中益气”中药之一。

黄芪原名为黄耆,《本草纲目》中称:“耆,长也,色黄者黄耆,乃补药之长”。药理研究表明,黄芪具有抗氧化、抗炎、免疫调节、抗癌、降血脂、抗高血糖和保肝作用。研究证实,黄芪对衰老进程中出现的代谢和免疫失调、神经系统衰退、心血管老化、自由基堆积^[9]、肠道菌群紊乱^[10]等方面都具有一定的改善作用。然而,黄芪对于衰老时肠道稳态失衡的调控作用尚未见报道。此外,黄芪的作用多基于D-半乳糖诱导的衰老加速模型^[11]以及快速老化小鼠(senescence accelerated mouse/prone, SAMP)模型^[12],很少采用自然衰老小鼠模型进行研究。因此,本研究采用自然衰老小鼠模型^[13],观察黄芪对自然衰老小鼠肠道功能及菌群稳态的影响,为进一步的机制研究提供实验依据。

材料与方法

动物 雄性SPF级的C57BL/6小鼠,体重 25 ± 5 g,购自山东斯科贝斯生物科技股份有限公司(中国),许可证号:SCXK(鲁)20160001,动物合格证号:1108382011000416。小鼠饲养于南京中医药大学药物安全评价中心,动物实验获得南京中医药大学动物伦理委员会批准。

药品与试剂 黄芪饮片购自安徽省万生中药饮片有限公司(批号:2219044);PBS购自南京生航生物技术有限公司(批号:BC20191230);乙二胺四乙二钠购自国药集团化学试剂有限公司(批号:20160824);甲基纤维素(批号:C11556751)、胭脂红(批号:C11707035)、无水葡萄糖(批号:C11434522)购自上海麦克林生化科技有限公司;血糖试纸购自Roche Diabetes Care GmbH罗氏血糖健康医护公司;肿瘤环

死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 试剂盒 (批号: 202103)、白介素-10 (interleukin-10, IL-10) 试剂盒 (批号: 202103)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 试剂盒 (批号: 202103) 购自南京金益柏生物科技有限公司; 淀粉酶试剂盒 (批号: 20210315)、脂肪酶试剂盒 (批号: 20210316) 均购自南京建成生物有限公司; 生理盐水购于四川科伦药业股份有限公司 (批号: L221020703)。Trizol 试剂 (批号: P10327)、EasyScript One-Step gDNA Removal、cDNA Synthesis SuperMix (批号: P20329) 和 TransStart Top Green qPCR SuperMix 均购于北京全式金生物技术有限公司。

仪器 Microfuge 22R 低温高速离心机 (Beckman 公司)、Millipore Direct-Q3 Advantag 超纯水系统 (美国 Millipore 公司)、XW-80A 微型旋涡混合仪 (上海沪西分析仪器厂)、Tissuelyer-48 组织研磨机 (上海净信实业发展有限公司)、ST60-4 微孔板恒温振荡器 (杭州米欧仪器有限公司)、ENSPiRE 多功能酶标仪 (PerkinElmer 公司)、ML-204/02 电子天平 (上海梅特勒-托利多仪器有限公司)、ZS-ZL 抓力测试仪 (北京众实迪创科技发展有限公司)、DFC7000 T 显微镜 (Leica 公司)、ABI-7500 实时荧光定量 PCR 仪 (赛默飞世尔科技公司)。

药物配制、分组及给药 黄芪水提取物: 准确称取黄芪干燥根 200 g, 加 8 倍的水煎煮 3 次, 每次 2 h; 合并水提液并进行旋蒸浓缩, 冷却, 缓慢加入 95% 乙醇使乙醇浓度为 80%, 静置过夜后抽滤, 得沉淀, 复溶挥去醇味, 最后冷冻干燥得到产物。黄芪醇提取物: 取水提后剩余药渣加 12 倍量 60% 醇煎煮 3 次, 每次 2 h, 合并醇提液并进行旋蒸浓缩, 挥去醇味, 最后冷冻干燥得到产物。黄芪总提取物: 将水提物及醇提物按其得率进行配比得到黄芪总提取物。

将 16 只 13 月龄 C57BL/6J 雄性小鼠随机分为 2 组, 分别为老年组 (Aged) 和黄芪给药组 (HQ), 每组 8 只。另取 8 只 3~4 月龄雄性 C57BL/6J 小鼠作为年轻对照组 (Young), 空白组小鼠每天规律给水喂食。给药: 正常组及模型组小鼠每日灌胃超纯水 1 次, 每 10 g 小鼠体重灌胃 0.1 mL。中国药典中规定黄芪临床用量为 9~30 g, 考虑到给药时间较长, 本研究选择临床低剂量 (10 g) 进行考察。按照人与小鼠剂量换算, 黄芪组小鼠每日灌胃黄芪总提取物 ($2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 1 次, 连续灌胃 5 个月至小鼠为 18 月龄。

日常体征观察 每周记录各组小鼠体重, 连续 17 周, 观察其体重变化。记录各组小鼠在灌胃第 5 个月即小鼠 18 月龄时的每周平均饮食饮水量, 连续监测 4 周。同时观察小鼠皮毛情况、行为等一般状态。

临床相关虚弱指数测量评分 在给药 5 个月后,

对小鼠进行基于临床相关的虚弱指数测量评分, 其中包括 31 项参数, 主要涉及外皮、身体/肌肉骨骼情况、眼睛、鼻、泌尿生殖和呼吸系统等方面, 每种参数根据严重程度, 以盲法评为 0、0.5 或 1 级, 具体评分方法参考以往文献^[4]。

肠道吸收、运动及消化功能检测 营养吸收功能: 葡萄糖吸收实验, 小鼠禁食 16 h 后灌胃 $2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 葡萄糖溶液。在 0、30、60、90 和 120 min 时进行小鼠尾静脉取血, 血糖试纸测定其血糖水平, 采用 DAS 软件计算血药浓度-时间曲线下面积 (area under the curve, AUC)。运动功能: 小鼠单独置于笼盒中, 将 250 μL 的 6% (w/v) 胭脂红染料在 0.5% (w/v) 甲基纤维素中混匀。从灌胃胭脂红染料到第一颗红色粪便出现的时间记录为肠道运输时间。消化酶分泌功能: 取一段回肠匀浆, 取上清。按照说明书要求测定其脂肪酶和淀粉酶的活性。

肠道炎症因子测定及肠组织病理学检查 采用 ELISA 方法按照试剂盒上的说明检测小鼠结肠组织中的 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 的浓度。采集空肠组织并固定于 4% 多聚甲醛组织固定液中, 常规石蜡包埋, 制片, 小肠切片脱蜡后进行 H&E 染色。采集结肠组织并固定于卡诺氏固定液中, 常规石蜡包埋, 切片脱蜡后进行 AB 染色。显微镜下观察拍照, Image Pro 进行分析。

肠道不同类型细胞标志物相关基因转录水平检测 采用常规方法提取肠道组织中 RNA 并按照逆转录试剂盒说明书转录得到互补的 cDNA, 最终使用 PCR 基因扩增仪进行扩增。PCR 反应每个样品进行 3 次重复实验, PCR 扩增反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 然后进入循环阶段, 每个循环包括 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 34 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 45 个循环。最后以目的基因与 β -actin 含量比值表示目的基因的表达水平。扩增数据按照 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 的方法进行数据处理。使用的引物序列见表 1。

肠道细菌 16S rDNA 测序 黄芪给药 5 个月后, 取各组小鼠新鲜粪便, 粪便微生物 16S rDNA 测序委托上海美吉生物科技有限公司进行。微生物多样性测序平台为 Illumina Miseq, 测序原理为合成测序法。对样品进行可操作分类单元 (OTU) 划分, 采取门、纲、目、科、属分类, 进行菌群的分类学组成分析。

统计学方法 采用 GraphPad Prism version 8.0 软件进行数据统计分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ($n \geq 3$)。采用 Nonparametric Mann-Whitney Test 进行组间差异性分析。 $P < 0.05$ 为有统计学显著性差异, $P < 0.01$ 为有统计学极显著差异。

Table 1 Primers for target genes in mice. *Lgr5*: Leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5; *Casp3*: Caspase 3; *Muc2*: Mucin 2; *Lyz1*: Lysozyme 1; *Neurog3*: Neurogenin 3; *Atoh1*: Atonal homolog 1

Gene	Primer (5'-3')
β -Actin	Forward: CTACAGCTTCACCACCACAG Reverse: ACCGCTCGTTGCCAATAGTG
<i>Lgr5</i>	Forward: TTACGTCTTGCTGAAATGCT Reverse: AGCATAAGCACTTTGAGGCTG
<i>Wnt3</i>	Forward: TTCTTACTTGAGGGCGGAGA Reverse: ACCCGTATCCAGACAGGA
<i>Notch1</i>	Forward: GCTGCCTCTTTGATGGCTTCGA Reverse: CACATTCGGCACTGTACAGCC
<i>Casp3</i>	Forward: TGACTGAAAAGCCGAAACTC Reverse: AGCCTCCACCGGTATCTTCT
KI67	Forward: TGCCAGGCTATGCTAATGACT Reverse: GCTCTTGTGTGGTGTGGACT
<i>Muc2</i>	Forward: GCTGACGAGTGGTTGGTGAATG Reverse: GATGAGGTGGCAGACAGGAGAC
<i>Lyz1</i>	Forward: GAGACCGAAGCACCGACTATG Reverse: CGGTTTTGACATTGTGTTCCG
<i>Neurog3</i>	Forward: CGCAAGAAGCCAATGATCG Reverse: AGAAGCTGTGGTCCGCTATG
<i>Atoh1</i>	Forward: AGCAAACAGGTGAATGGGGT Reverse: CTCCGACAGAGCGTTGATG

结果

1 黄芪对衰老小鼠的整体虚弱指数无显著改善作用

对于人类而言, 衰老研究的目的不仅是延长寿命, 更重要的是延长健康寿命。鉴于寿命 (实际年龄) 和健康寿命 (生物年龄) 会出现不对等, 因此需要对机体健康状况进行评估。“虚弱指数” (frailty index, FI) 是一种包括 31 项特定参数来量化机体虚弱程度的指标, 在临床已被作为衡量老龄化的指标之一^[15]。本研究评估了在黄芪给药 5 个月后每只小鼠 (18 月龄) 的各项指标评分以及总 FI (图 1)。结果显示, 年轻组整体评分最低, 健康状态最好, 衰老组的 FI 评分显著升高, 表明健康状态显著降低。与衰老组相比, 黄芪给药组 FI 整体评分有降低趋势, 但无显著性差异, 说明黄芪对衰老小鼠的衰老表型有一定的改善趋势。

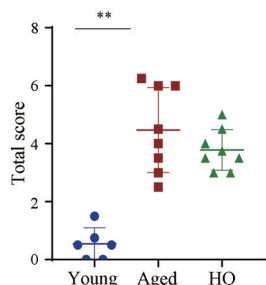


Figure 1 The total score of frailty index in different groups. $n = 6-8$, mean \pm SEM. ** $P < 0.01$

2 黄芪能显著改善衰老小鼠毛发以及体能情况

在对于小鼠的日常体征观察中发现, 黄芪对衰老小鼠的体重、饮水量和饮食量无影响 (图 2A~C), 但是黄芪对于衰老小鼠毛发的改善作用效果显著 (图 2D)。衰老小鼠出现皮毛光泽度下降以及脱毛等现象, 黄芪给药后, 小鼠皮毛光泽度增加, 脱毛现象减轻。皮肤组织 H&E 切片结果也表明, 衰老小鼠皮肤毛囊数量显著降低, 黄芪给药后小鼠毛囊数量增加 (图 2D、E)。

除此之外, 衰老小鼠出现抓力降低, 游泳时间显著缩短, 提示衰老小鼠的力量及耐力均显著减退 (图 2F~H)。黄芪干预对衰老小鼠抓力无显著改善作用 (图 2F、G), 但是能显著增加其游泳时间 (图 2H), 提示黄芪能改善衰老小鼠的耐力, 但对肌肉力量无改善作用。

3 黄芪能改善衰老小鼠肠道吸收及运动功能, 减轻肠道炎症

衰老会导致机体代谢功能下降, 其中消化系统的变化尤为显著, 表现为肠道的吸收及运输功能下降等^[16]。通过葡萄糖吸收实验以评估小鼠的肠道吸收功能, 结果显示, 衰老小鼠吸收葡萄糖的能力显著降低, 黄芪给药组在 30、60、120 min 时葡萄糖吸收能力显著增加 (图 3A)。同时, 黄芪能增加葡萄糖的浓度-时间曲线下面积 (图 3B), 提示黄芪可显著改善衰老小鼠的肠道吸收功能。此外, 衰老小鼠肠道中的淀粉酶和脂肪酶分泌下降^[17], 黄芪给药后脂肪酶较衰老组分泌增多, 活性增强, 但对于淀粉酶无影响 (图 3C)。以上结果表明, 黄芪对衰老小鼠的肠道吸收功能具有改善作用。

在衰老过程中, 由于肠道收缩蠕动功能减弱, 肠道运输时间增长。本研究结果也发现, 衰老小鼠肠道运输时间显著增加, 提示衰老小鼠出现肠道运动功能障碍。黄芪给药组的肠道运输时间显著降低, 说明黄芪能够减轻衰老小鼠肠道运动功能障碍 (图 3D)。同时发现, 衰老小鼠结肠与小肠的长度出现代偿性增长, 这可能也是衰老时肠道运输时间增长的原因之一, 但黄芪给药不影响其长度变化 (图 3E、F)。以上结果提示, 黄芪是通过促进肠道的运动功能进而缩短肠道运输时间。

ELISA 检测结果显示, 衰老小鼠肠道中 TNF- α 和 IL-6 等促炎因子水平升高^[18], 抗炎因子 IL-10 水平显著降低, 提示衰老小鼠出现肠道炎症。黄芪给药后, 小鼠肠道中 TNF- α 和 IL-6 水平均显著降低, 但 IL-10 水平无显著改变 (图 3G)。以上结果提示, 黄芪对衰老小鼠肠道组织的免疫平衡具有调节作用。

4 黄芪可改善衰老小鼠肠道组织结构

衰老会导致肠道组织结构发生改变。随着年龄的

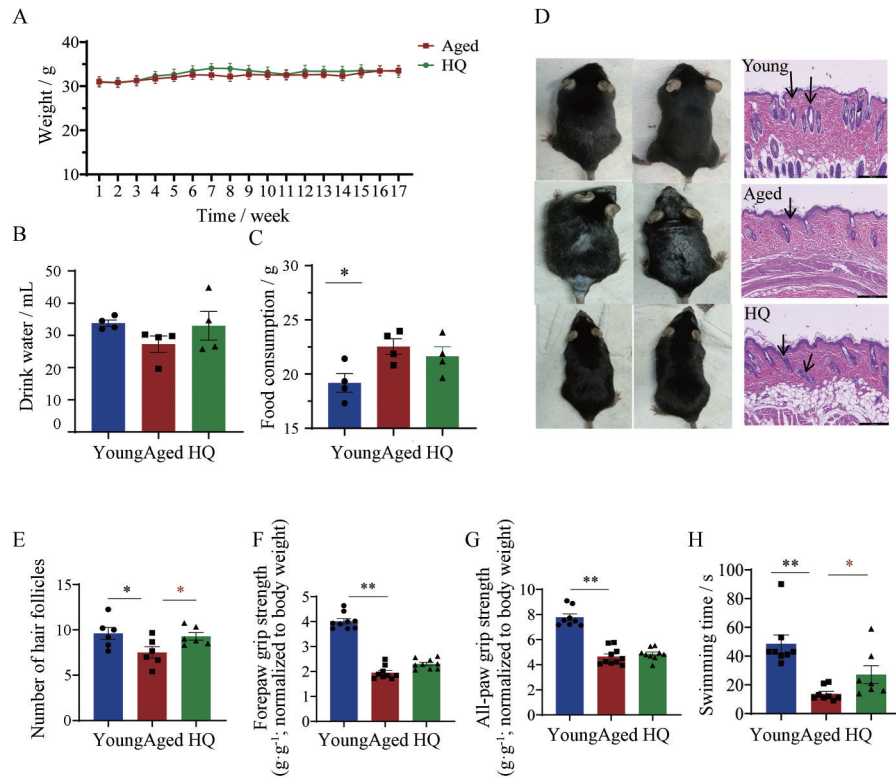


Figure 2 Effects of *Astragalus* on the daily indicators of aging phenotype. A-C: Changes of body weight, water and food consumption in different groups; D: Representative pictures of hematoxylin-eosin (H&E)-stained skin tissue. Scale bar: 282.5 μm ; E: Number of hair follicles; F, G: Evaluation of forepaw (F) and all-paw (G) grip strength; H: Evaluation of swimming time. $n = 6-8$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

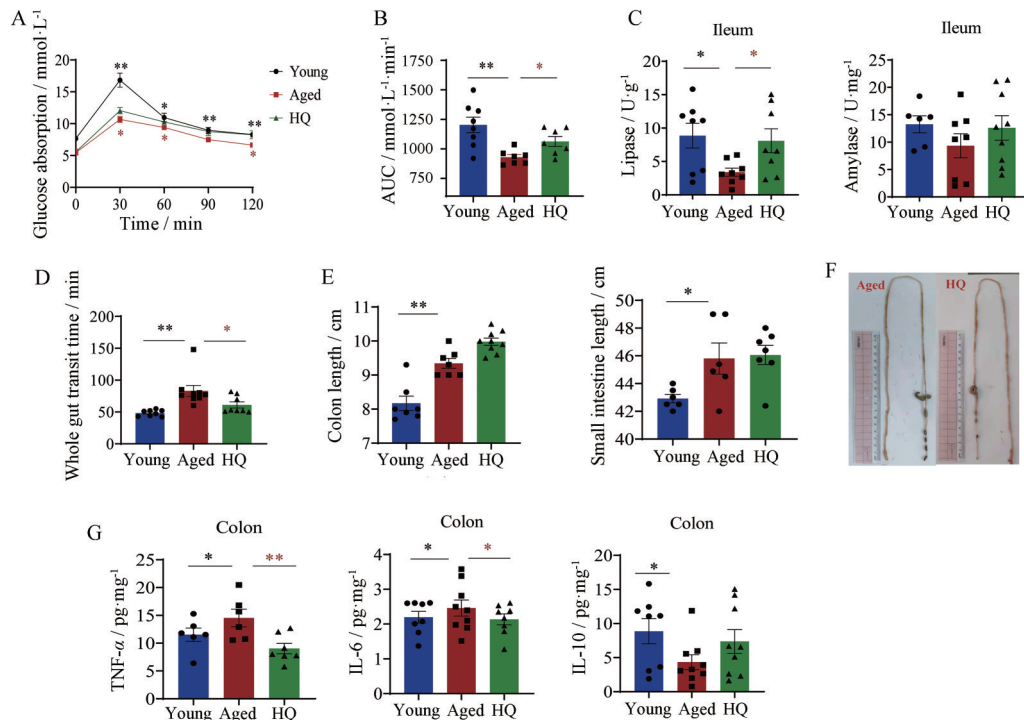


Figure 3 Effects of *Astragalus* on the intestinal function and inflammatory cytokines of aging mice. A: Glucose absorption ability; B: Area under the curve (AUC) of different groups; C: Lipase and amylase activity in ileum; D: Whole gut transit time; E: Colon and small intestine length; F: Representative pictures of intestine; G: Inflammatory cytokines including TNF- α , IL-6 and IL-10 in colon. $n = 6-8$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. TNF- α : Tumor necrosis factor- α ; IL: Interleukin

增长,小肠的消化和吸收能力下降,肠黏膜屏障受损,具体表现为肠绒毛数量减少、长度变短^[19],隐窝数量减少,杯状细胞减少,肠道黏膜变薄^[20]。空肠组织 H&E 染色结果可见,与年轻组小鼠相比,衰老小鼠的空肠绒毛长度缩短。黄芪给药后,小鼠的空肠绒毛长度显著增加,基本恢复至年轻组小鼠水平(图 4A、B)。与年轻组小鼠相比,衰老小鼠的小肠隐窝深度显著降低,黄芪对衰老小鼠的隐窝深度无显著影响(图 4B)。杯状细胞是一种肠道分泌细胞,能够分泌黏蛋白,形成黏膜屏障保护肠道^[21]。结肠 AB 染色结果显示,与年轻组小鼠相比,衰老小鼠结肠组织的杯状细胞数量减少,结肠黏膜厚度变薄,黄芪给药后能显著逆转这一趋势,增加衰老小鼠杯状细胞数量和结肠黏膜厚度,改善肠道病理情况(图 4C、D)。

5 黄芪能促进 ISC 的增殖与分化,恢复 ISC 功能

衰老最终导致组织再生能力和器官维持能力下降。老龄小鼠小肠再生潜力下降,ISC 数量减少,功能衰退。Wnt 信号通路作为维持肠黏膜更新的主要动力^[22],在 ISC 的增殖与分化中起重要作用。Notch 信号通路导向 ISC 分化的方向^[23]。结果发现,与年轻小鼠相比,衰老小鼠 ISC 标志物富含亮氨酸重复序列的 G 蛋白偶联受体 5 (leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5, Lgr5)、增殖相关信号通路 Wnt3、增殖标志物 KI67^[24]、分化相关信号通路 Notch 基因表达降低,凋亡标志物半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (caspase 3, Casp3) 升高。黄芪能够通过激活 Wnt 和 Notch 通路,增加 ISC 标志物 Lgr5 的表达,但是黄芪对于 KI67 以及 Casp3 无显著影响(图 5A)。

ISC 可分化为不同的分泌系细胞,主要包括杯状

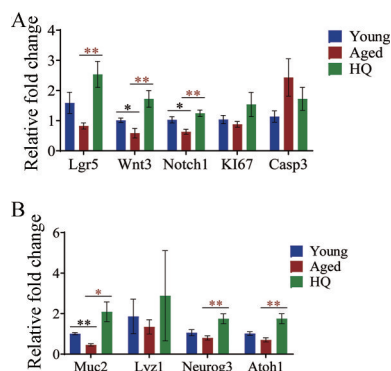


Figure 5 Effect of *Astragalus* on the transcription of mRNA related to the proliferation and differentiation of intestinal stem cells. A: mRNA levels of Lgr5, Wnt3, Notch1, KI67 and Casp3 in jejunum; B: mRNA levels of Muc2, Lyz1, Neurog3 and Atoh1 in jejunum. $n = 5-6$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

细胞、潘氏细胞、内分泌细胞和分泌细胞。在衰老进程中,杯状细胞标志物黏蛋白 2 (mucin 2, Muc2) 表达显著降低,潘氏细胞标志物溶菌酶 1 (lysozyme 1, Lyz1)、内分泌细胞神经原素 3 (neurogenin 3, Neurog3) 和分泌细胞标志物无调同源物 1 (atonal homolog 1, Atoh1) 表达有一定的下降趋势,黄芪可促进 Muc2、Atoh1 及 Neurog3 表达升高,但对于 Lyz1 表达无显著性影响,表明黄芪能够增加肠道杯状细胞、内分泌细胞和分泌细胞数量,但对于潘氏细胞无影响(图 5B),提示黄芪能调控 ISC 向分泌细胞系的分化,使肠道功能性细胞增多。

6 黄芪能够改善衰老小鼠肠道菌群紊乱

近年来,大量研究表明肠道衰老往往伴随着肠道菌群的紊乱,肠道微生物群落在调节机体健康状况和寿命中起到了关键作用^[25]。

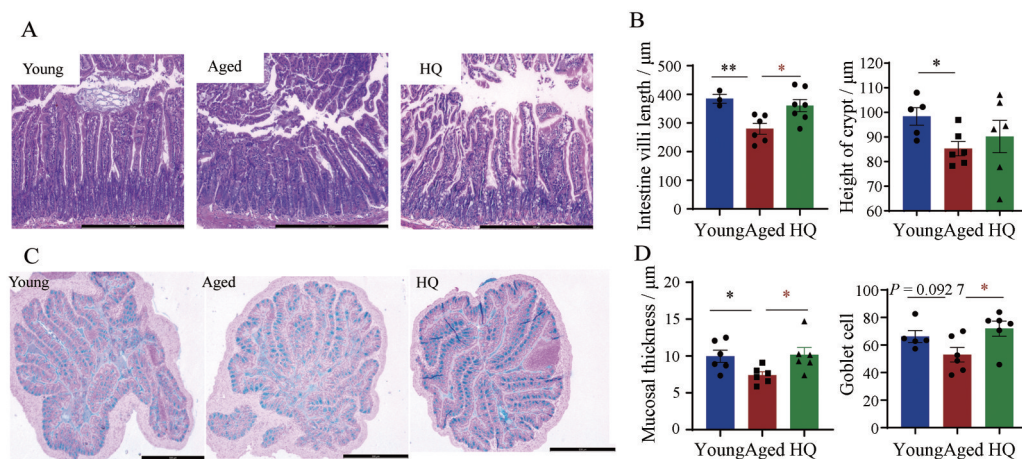


Figure 4 Effect of *Astragalus* on pathological changes of intestine tissue in aging mice. A: Representative pictures of H&E-stained jejunum tissue. Scale bar: 500 μ m; B: Height of intestine villi and crypt in jejunum; C: Representative pictures of PAS-stained colon tissue. Scale bar: 500 μ m; D: Number of goblet cell and thickness of mucus layer in colon. $n = 6-8$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

6.1 黄芪可恢复衰老小鼠肠道菌群多样性 对小鼠肠道菌群进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) (图 6A), 年轻与衰老组小鼠肠道菌群的整体组成存在较大差异。此外, 衰老组 Shannon 指数较年轻组明显下降, 黄芪能够提高 Shannon 指数 (图 6B), 提示黄芪干预后恢复小鼠肠道菌群多样性。在门水平下, 年轻组与衰老组的肠道菌群表现出一定的差异 (图 6C), 衰老小鼠放线菌门细菌丰度显著升高, 弯曲菌门细菌丰度显著降低, 而黄芪对于肠道菌群门水平无显著影响 (图 6D、E)。

6.2 黄芪显著上调衰老小鼠厚壁菌门-毛螺菌科细菌属和种水平 进一步分析发现, 黄芪对厚壁菌门 (Firmicutes) 下的科、属、种具有明显的调控作用, 尤其对毛螺菌科 (Lachnospiraceae) 下的属和种的调控效应最为显著, 而对其他菌门的调控作用较少。在毛螺菌科细菌属水平下进一步分析发现 (图 7A), 黄芪可以使其部分下降的菌属丰度被显著调回, 具体表现为上调 *Lachnospiraceae_NK4A136_group*、*Lachnoclostridium*、*Lachnospiraceae_FCS020_group* 和 *Family_XIII_UCG-001* 的丰度。

此外, 相对于厚壁菌门下其他菌科的菌属, 黄芪也有一定的调控作用。主要包括 *unclassified_f_Anaerovoracaceae*、*unclassified_c_Clostridia*、*Candidatus_Arthromitus* 和 *Ruminococcus*, 使其显著上调 (图 7B)。

细菌种水平分析结果与属水平呈现相似的趋势, 黄芪干预使毛螺菌科下细菌种水平显著扩增, 促进 *unclassified_g_Lachnoclostridium*、*Marvinbryantia*、

g_norank_f_UCG-010、*Dorea_sp._5-2*、*uncultured_bacterium_g_Family_XIII_UCG-001* 等有益菌的生长 (图 7C)。同时, 对于厚壁菌门下其他种水平的细菌, 主要包括 *uncultured_bacterium_g_Colidextribacter*、*uncultured_bacterium_g_Oscillibacter* 和 *unclassified_c_Clostridia*, 显著逆转其下降的趋势 (图 7D)。

热图显示 (图 8), 年轻小鼠与衰老小鼠在毛螺菌属细菌中具有显著性差异, 衰老小鼠毛螺菌属细菌整体丰度显著下降, 而黄芪能显著回调毛螺菌属细菌相对丰度。

6.3 黄芪对于其他门水平下肠道菌群的调控作用 除对部分厚壁菌门的细菌发挥上调作用以外, 黄芪能够升高拟杆菌门下菌种 *unclassified_g_Odoribacter* (图 9A)、脱硫菌门下菌属 *Bilophila* 和菌种 *uncultured_bacterium_g_Bilophila* 的细菌丰度 (图 9B)。同时, 对于放线菌门科水平 Actinomycetaceae、属水平 *Actinomyces* 以及种水平 *unclassified_g_Enterorhabdus* 都有一定的下调作用 (图 9C), 而放线菌属多为致病菌。此外, 对变形菌门细菌菌属 *Proteobacteria* 以及菌种 *unidentified_rumen_bacterium_RF32* 也有一定的调控作用 (图 9D)。

综上, 黄芪可恢复衰老小鼠的肠道菌群生物多样性, 选择性地促进衰老小鼠肠道内的厚壁菌门 (Firmicutes) 毛螺菌科 (Lachnospiraceae) 下细菌的生长, 抑制放线菌的生长, 改善了衰老小鼠肠道菌群失调, 恢复小鼠肠道稳态。

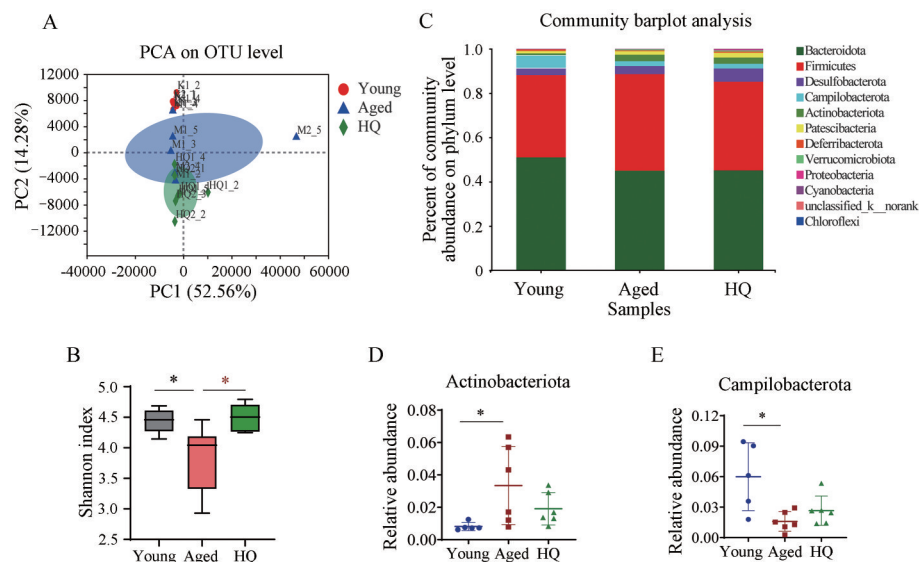


Figure 6 *Astragalus* regulates the intestinal microbiota dysbiosis on the overall level in aging mice. A: Principal component analysis (PCA) based on Bray-Curtis similarity; B: Shannon index in different groups; C: Relative abundance of gut microbiota at the phylum level; D, E: Relative abundance of the significantly-altered bacteria at the phylum levels, including Actinobacteriota and Campilobacterota. $n = 5-6$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$

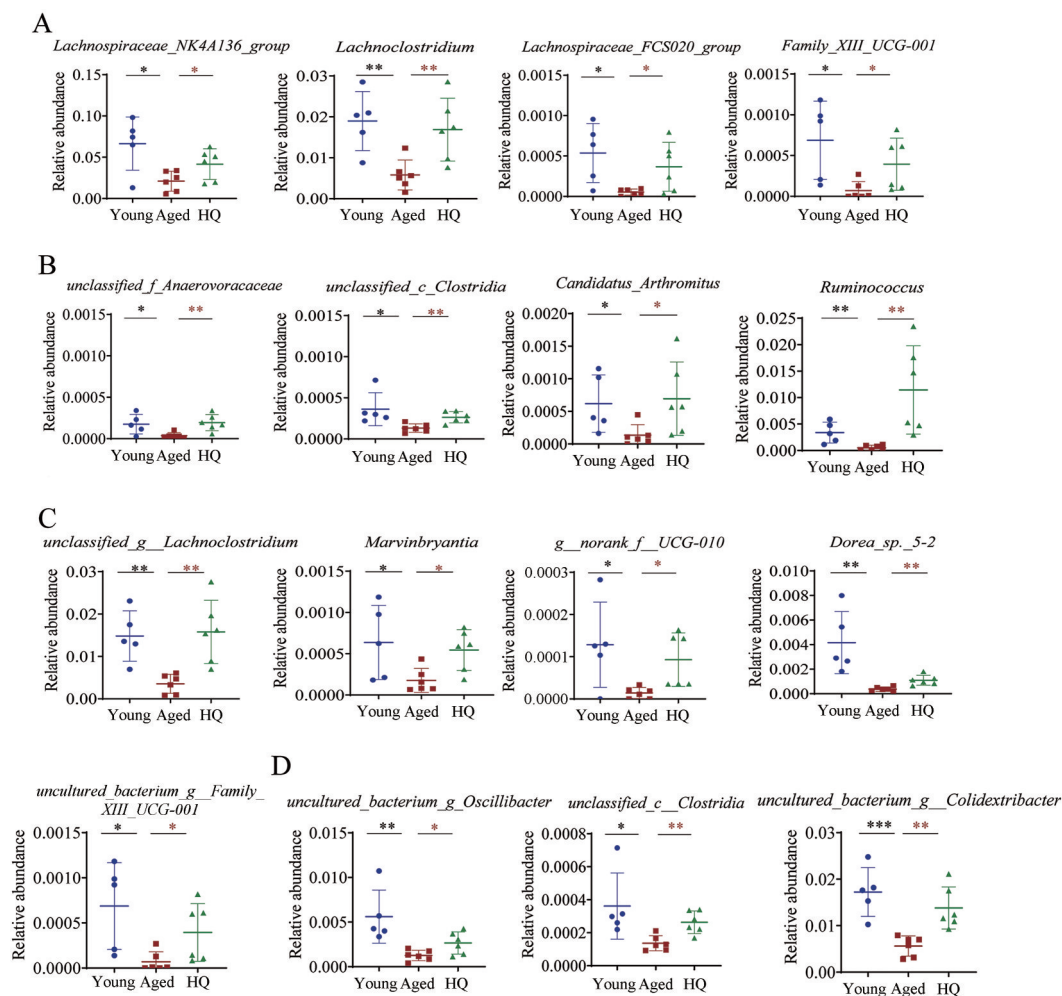


Figure 7 *Astragalus* partly improves the relative abundance of Firmicutes in aging mice. A: Relative abundance of Lachnospiraceae at the genus level; B: Relative abundance of Firmicutes at the genus level except Lachnospiraceae; C: Relative abundance of Lachnospiraceae at the species level; D: Relative abundance of Firmicutes at the species level except Lachnospiraceae. $n = 5-6$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

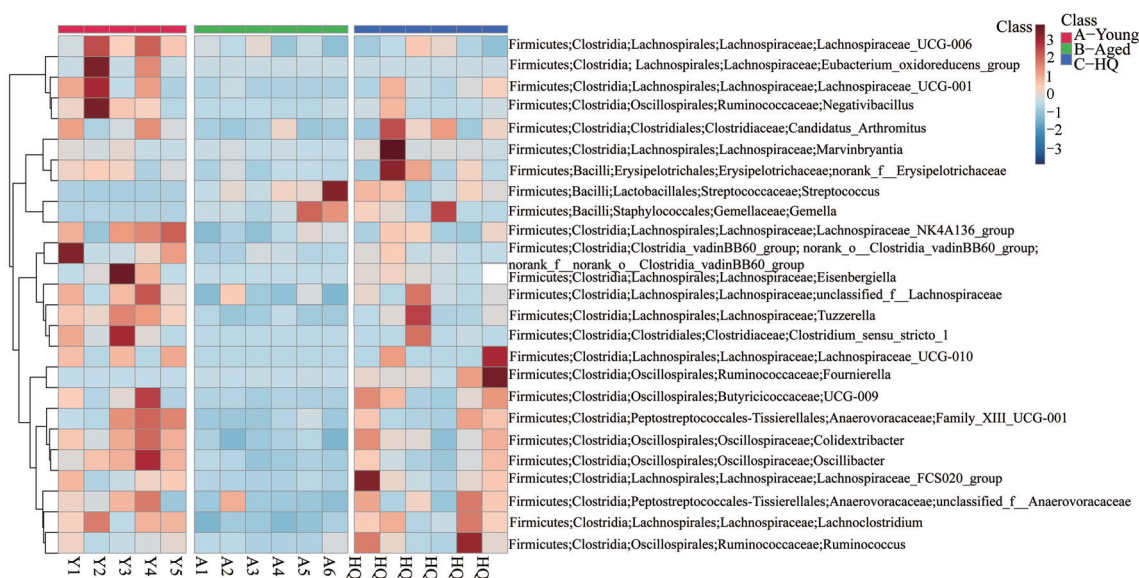


Figure 8 The heat map shows the relative abundance of Lachnospiraceae at the genus level in different groups

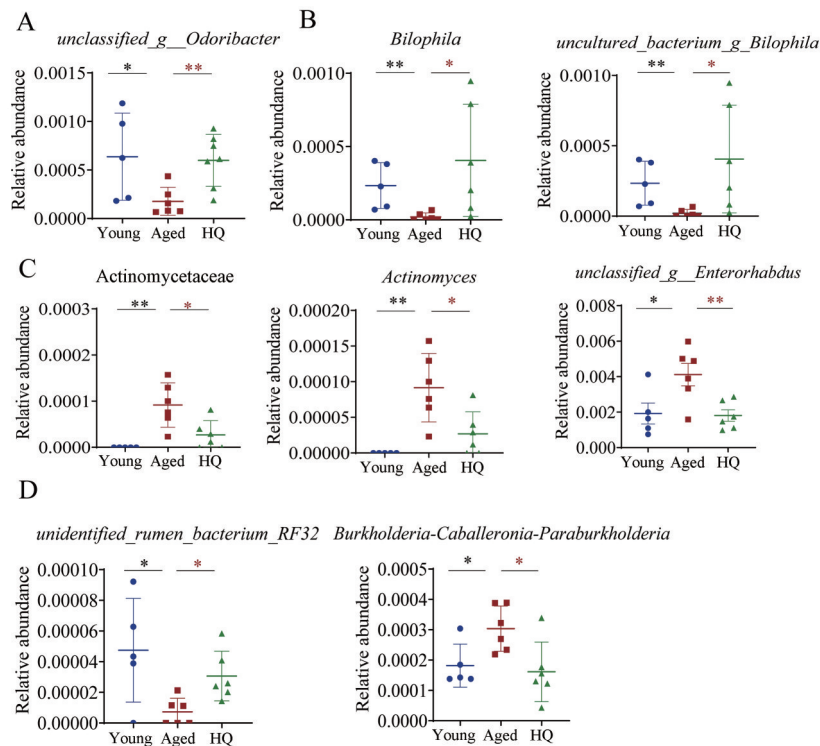


Figure 9 *Astragalus* modulated the relative abundance of other phyla except Firmicutes in aging mice. Relative abundance of the significantly-altered bacteria in Bacteroidota (A), Desulfobacterota (B), Actinobacteriota (C), Proteobacteria (D). $n = 5-6$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

讨论

目前,全世界老年人口的比例正在迅速增长,衰老已是国际面临的难题。衰老是不可逆转的自然规律,研究者不能阻止衰老,但能延缓衰老。中药多靶点多环节的作用机制以及其部分能够药食两用的特性是延缓衰老的一个重要方向。在抗衰老方面,黄芪具有独特的疗效。黄芪中的有效成分环黄芪醇,是现今唯一发现的端粒酶激活剂,黄芪多糖^[26]、甲苷和黄酮^[27]等活性成分具有免疫调节及抗氧化作用。黄芪改善衰老在许多组织器官中已有研究,但黄芪对于肠道衰老研究甚少。仅有研究发现,黄芪可以调控臭氧诱导的衰老小鼠的肠道菌群紊乱,但并不深入。因此,本研究建立自然衰老小鼠模型,全面探讨黄芪对于肠道功能及菌群稳态的影响。研究结果显示,黄芪不影响衰老小鼠的整体虚弱指数,但对毛发以及体能有显著性作用。在肠道功能方面,黄芪可促进肠道的吸收及运输;降低衰老小鼠肠道组织炎症水平;改善衰老小鼠的肠道组织病理变性。此外,黄芪给药能促进肠干细胞的增殖与分化,改善肠道菌群紊乱。

肠道微生物组被认为是宿主的“第二基因组”,对维持机体的稳态具有重要作用。有研究表明老年机体的肠道微生态特征为多样性较低,而益生菌群如毛螺菌科 (*Lachnospiraceae*)、瘤胃菌科 (*Ruminococcaceae*)^[28]

和艾克曼菌属 (*Akkermanisia*) 会有所减少^[29]。黄芪可以调控肠道菌群紊乱,主要通过上调衰老相关菌群如厚壁菌门 (*Firmicutes*) 下毛螺菌科 (*Lachnospiraceae*) 细菌的丰度。

文献报道,毛螺菌科可以加速菌群毒素的排泄和脂肪酸的生物合成,从而缓解肠道炎症^[30]。有研究证实 *Lachnospiraceae_NK4A136_group* 被认为是肠道益生菌,与肠道炎症呈负相关^[31],这与本研究结果相一致。衰老小鼠饮食中缺乏色氨酸会降低毛螺菌科丰度,导致炎症因子如 IL-6 的升高^[32]。同时,毛螺菌科中的某些菌属如 *Lachnospiraceae_NK46_group*、*Lachnospiraceae_FCS020_group* 为短链脂肪酸产生菌,其主要产物丁酸盐优先作为肠黏膜的主要能量来源,保护肠道屏障功能^[33]。但丁酸对于肠道的作用也有一定的争议,有文献报道丁酸在一定浓度下会限制肠干细胞的增殖,导致肠道 KI67 表达减少^[34]。细菌代谢产物乙酸是为宿主提供能量的主要来源,参与多种碳水化合物的代谢^[35]。黄芪可以通过调节部分短链脂肪酸合成细菌的丰度,进而提高肠道内短链脂肪酸的含量,调节菌群平衡及改善肠道功能。

毛螺菌科细菌可将色氨酸代谢为 3-羧基醛和犬尿酸,这些代谢产物对肠上皮屏障功能具有一定的保护作用,可增长肠道绒毛长度,增厚黏液层^[36]。毛螺菌科

细菌也参与初级胆汁酸向次级胆汁酸的生成,胆汁酸能够作为消化液促进脂类的消化与吸收并且刺激肠道蠕动^[37]。这可能也是黄芪能够改善肠道蠕动与吸收功能的重要原因之一。

除毛螺菌科以外,本研究发现的其他差异菌种如瘤胃球菌属 *Ruminococcus*, 其主要发酵代谢产物为乙酸和甲酸,能够吸收单糖和降解黏蛋白,这可能是黄芪增加衰老小鼠肠道吸收葡萄糖能力的原因。脱硫菌门下菌属 *Bilophila* 与心血管疾病风险呈显著负相关,嗜胆菌属可代谢三甲胺及其前体,且不产生氧化三甲胺,对衰老有改善作用^[38]。黄芪对于放线菌门中的部分致病菌丰度也有一定的下调作用。

随着年龄增长,小鼠小肠消化吸收功能减退,这与小鼠小肠上皮细胞增殖能力下降,杯状细胞、潘氏细胞和干细胞数目减少有关。肠干细胞的减少和功能衰退是肠道衰老的重要体现。本研究发现黄芪通过激活 Wnt 和 Notch 信号通路,调控肠干细胞的增殖与分化,特别是调控其向分泌细胞系的分化,使肠道功能性细胞增多,但并不影响与细胞增殖与凋亡的相关基因。目前,肠道菌群调控肠干细胞是一个研究热点。已有研究证实,罗伊氏乳杆菌能够增加丁酸的含量,促进肠上皮细胞的增殖。植物乳杆菌产生的乳酸能够激活 G 蛋白偶联受体 81 受体,诱导基质细胞和潘氏细胞分泌 Wnt3 细胞因子,激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,促进肠干细胞介导的上皮细胞再生^[39]。这提示黄芪对于肠道干细胞的增殖与分化的促进作用以及对于肠道菌紊乱的调节可能是探索黄芪延缓肠道衰老的重要突破口,但其具体机制还需要进一步研究。

本研究从肠道功能及菌群稳态等方面探讨黄芪改善肠道衰老的作用特征,为黄芪用于延缓衰老及开发利用提供科学依据。黄芪对于肠道菌群以及肠干细胞的调控机制尚需进一步研究。

作者贡献: 尹佳婷为本文所涉及实验的主要完成者及文章主要撰写者;杨淑惠、李成曦负责部分实验研究;刘云及王雨萌负责部分数据采集与处理分析工作;段金廛为本文提供修改意见;郭建明提出本文思路并参与文章撰写与修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Partridge L, Fuentelba M, Kennedy BK. The quest to slow ageing through drug discovery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19: 513-532.
- [2] Zheng WG, Qin XM, Gao L, et al. The mechanism of senescence-related secretory phenotype and the research progress of related drugs [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 8-14.
- [3] Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing [J]. *Nature*, 2010, 464: 59-65.
- [4] Fisher DW, Luu P, Agarwal N, et al. Loss of HCN2 leads to delayed gastrointestinal motility and reduced energy intake in mice [J]. *PLoS One*, 2018, 13: e0193012.
- [5] Martinez-Guryn K, Hubert N, Frazier K, et al. Small intestine microbiota regulate host digestive and absorptive adaptive responses to dietary lipids [J]. *Cell Host Microbe*, 2018, 23: 458-469.e5.
- [6] Thevaranjan N, Puchta A, Schulz C, et al. Age-associated microbial dysbiosis promotes intestinal permeability, systemic inflammation, and macrophage dysfunction [J]. *Cell Host Microbe*, 2018, 23: 570.
- [7] Mihaylova MM, Cheng CW, Cao AQ, et al. Fasting activates fatty acid oxidation to enhance intestinal stem cell function during homeostasis and aging [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22: 769-778.e4.
- [8] Chen Y, Zhang S, Zeng B, et al. Transplant of microbiota from long-living people to mice reduces aging-related indices and transfers beneficial bacteria [J]. *Aging*, 2020, 12: 4778-4793.
- [9] Liu P, Zhao H, Luo Y, et al. Anti-aging implications of *Astragalus membranaceus* (Huangqi): a well-known Chinese tonic [J]. *Aging Dis*, 2017, 8: 868-886.
- [10] Yan M, Song H, Xie N, et al. Changes of intestinal flora in senile mouse models and the antagonistic activity of the root of *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bge. [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 1995, 20: 624-626.
- [11] Li XT, Zhang YK, Kuang HX, et al. Mitochondrial protection and anti-aging activity of *Astragalus* polysaccharides and their potential mechanism [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13: 1747-1761.
- [12] Zhang GL, Cheng WJ, Li W, et al. Effects of serums containing Buzhong Yiqi decoction with *Astragalus Radix* or *Hedysari Radix* on anti-immunosenescence in spleen lymphocytes of SAMP8 mice [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2016, 41: 2888-2894.
- [13] Zhou YZ, Yan ML, Gao L, et al. Research on aging animal model and its application in anti-aging drug activity screening [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2017, 48: 1061-1071.
- [14] Whitehead JC, Hildebrand BA, Sun M, et al. A clinical frailty index in aging mice: comparisons with frailty index data in humans [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2014, 69: 621-632.
- [15] Asadi Shahmirzadi A, Edgar D, Liao CY, et al. Alpha-ketoglutarate, an endogenous metabolite, extends lifespan and compresses morbidity in aging mice [J]. *Cell Metab*, 2020, 32: 447-456.e6.
- [16] He D, Wu H, Xiang J, et al. Gut stem cell aging is driven by mTORC1 via a p38 MAPK-p53 pathway [J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 37.
- [17] Wang H, Sun Y, Xin J, et al. *Lactobacillus johnsonii* BS15 prevents psychological stress-induced memory dysfunction in mice by modulating the gut-brain axis [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 1941.

- [18] Davizon-Castillo P, McMahon B, Aguila S, et al. TNF- α -driven inflammation and mitochondrial dysfunction define the platelet hyperreactivity of aging [J]. *Blood*, 2019, 134: 727-740.
- [19] Li GL, Guo CY, Wu SH, et al. Study on the regulation effect of hemp seed oil on intestinal function in *D*-galactose-induced aging mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2020, 51: 3509-3517.
- [20] van der Lugt B, van Beek AA, Aalvink S, et al. *Akkermansia muciniphila* ameliorates the age-related decline in colonic mucus thickness and attenuates immune activation in accelerated aging *Erec1^{LA7}* mice [J]. *Immune Ageing*, 2019, 16: 6.
- [21] Gebert N, Cheng CW, Kirkpatrick JM, et al. Region-specific proteome changes of the intestinal epithelium during aging and dietary restriction [J]. *Cell Rep*, 2020, 31: 107565.
- [22] Nalapareddy K, Nattamai KJ, Kumar RS, et al. Canonical Wnt signaling ameliorates aging of intestinal stem cells [J]. *Cell Rep*, 2017, 18: 2608-2621.
- [23] Cheng CW, Biton M, Haber AL, et al. Ketone body signaling mediates intestinal stem cell homeostasis and adaptation to diet [J]. *Cell*, 2019, 178: 1115-1131.e15.
- [24] Powell DN, Swimm A, Sonowal R, et al. Indoles from the commensal microbiota act *via* the AHR and IL-10 to tune the cellular composition of the colonic epithelium during aging [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117: 21519-21526.
- [25] Biagi E, Franceschi C, Rampelli S, et al. Gut microbiota and extreme longevity [J]. *Curr Biol*, 2016, 26: 1480-1485.
- [26] Zheng Y, Ren W, Zhang L, et al. A review of the pharmacological action of *Astragalus* polysaccharide [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 349.
- [27] Zhou RY, Sun MT, Liu J, et al. Research progress of active ingredients of traditional Chinese medicine in anti-aging and anti-tumor mechanism [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 1856-1864.
- [28] Bunker JJ, Drees C, Watson AR, et al. B cell superantigens in the human intestinal microbiota [J]. *Sci Transl Med*, 2019, 11: eaau9356.
- [29] DeJong EN, Surette MG, Bowdish DME, et al. The gut microbiota and unhealthy aging: disentangling cause from consequence [J]. *Cell Host Microbe*, 2020, 28: 180-189.
- [30] Chen L, Wilson JE, Koenigsnecht MJ, et al. NLRP12 attenuates colon inflammation by maintaining colonic microbial diversity and promoting protective commensal bacterial growth [J]. *Nat Immunol*, 2017, 18: 541-551.
- [31] Li J, Wu T, Li N, et al. Bilberry anthocyanin extract promotes intestinal barrier function and inhibits digestive enzyme activity by regulating the gut microbiota in aging rats [J]. *Food Funct*, 2019, 10: 333-343.
- [32] Yusufu I, Ding K, Smith K, et al. A tryptophan-deficient diet induces gut microbiota dysbiosis and increases systemic inflammation in aged mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 5005.
- [33] Gao J, Guo X, Wei W, et al. The association of fried meat consumption with the gut microbiota and fecal metabolites and its impact on glucose homeostasis, intestinal endotoxin levels, and systemic inflammation: a randomized controlled-feeding trial [J]. *Diabetes Care*, 2021, 44: 1970-1979.
- [34] Kaiko GE, Ryu SH, Koues OI, et al. The colonic crypt protects stem cells from microbiota-derived metabolites [J]. *Cell*, 2016, 167: 1137.
- [35] Wu T, Shen M, Yu Q, et al. Cyclocarya paliurus polysaccharide improves metabolic function of gut microbiota by regulating short-chain fatty acids and gut microbiota composition [J]. *Food Res Int*, 2021, 141: 110119.
- [36] Guo H, Chou WC, Lai YJ, et al. Multi-omics analyses of radiation survivors identify radioprotective microbes and metabolites [J]. *Science*, 2020, 370: eaay9097.
- [37] Guo H, Chou WC, Lai Y, et al. Effects of tartary buckwheat protein on gut microbiome and plasma metabolite in rats with high-fat diet [J]. *Foods*, 2021, 10: 2457.
- [38] Kivenson V, Giovannoni SJ. An expanded genetic code enables trimethylamine metabolism in human gut bacteria [J]. *mSystems*, 2020, 5: e00413-20.
- [39] Lee S, Kim TY, Kim Y, et al. Microbiota-derived lactate accelerates intestinal stem-cell-mediated epithelial development [J]. *Cell Host Microbe*, 2018, 24: 833-846.e6.