黄芩苷通过调控菌群–胆汁酸–肠屏障缓解二甲双胍诱导的小鼠早期腹泻的机制研究

王爱婷[1,2], 苗增慧[1,2], 张　颖[1,2], 龙江兰[1,2], 鄢　丹[1,2*]

(1. 首都医科大学附属北京友谊医院, 北京市临床药学研究所, 北京 100050;　2. 首都医科大学附属北京友谊医院, 消化健康全国重点实验室, 北京 100050)

摘要: 二甲双胍降糖效果显著, 但胃肠道不良反应的发生限制了其临床应用, 从调节肠道菌群角度切入进行中西药联合用药为二甲双胍不耐受提供解决思路。动物实验已获得首都医科大学附属北京友谊医院动物伦理委员会批准 (批准号: 23-2043)。选用C57BL/6J小鼠, 在高脂饮食 (high-fat diet, HFD) 喂养4周后, 连续7天灌胃大剂量二甲双胍 (metformin, 250 mg·kg^{-1}, bid) 构建腹泻小鼠模型 (HFDM), 另设置正常对照组 (normal chow diet, NCD)、高脂饮食组 (HFD)、联合用药组 (构建腹泻小鼠模型时同步灌胃黄芩苷, baicalin, 100 mg·kg^{-1}, bid, HFDMB), 通过观察小鼠粪便形态、监测腹泻评分、检测粪便含水量, 发现黄芩苷可缓解大剂量二甲双胍诱导的小鼠早期腹泻。对小鼠粪便进行全长16S rRNA测序, 发现联用黄芩苷显著降低与腹泻正相关的索氏志贺氏菌 *Shigella sonnei*、鸡肠球菌 *Enterococcus gallinarum*、海氏肠球菌 *Enterococcus hirae* 的相对丰度、升高有益菌约氏乳杆菌 *Lactobacillus johnsonii*、鼠乳杆菌 *Ligilactobacillus murinus*、罗伊氏黏液乳杆菌 *Limosilactobacillus reuteri* 的相对丰度。对小鼠结肠内容物进行胆汁酸靶向定量分析, 发现二甲双胍升高HFD小鼠结肠内容物初级胆汁酸牛磺鹅去氧胆酸 (taurochenodeoxycholic acid, TCDCA)、牛磺胆酸 (taurocholic acid, TCA) 等, 与HFDM相比, 联用黄芩苷可降低初级胆汁酸。对小鼠结肠组织切片进行H&E染色、免疫组化标记紧密连接蛋白闭合带蛋白-1 (zonula occludens-1, ZO-1) 和闭合蛋白 (occludin), 发现黄芩苷联合二甲双胍可减轻大剂量二甲双胍引起的小鼠结肠损伤、增强结肠紧密连接蛋白的表达。综上, 本研究揭示黄芩苷可通过调控肠道菌群–胆汁酸–肠屏障缓解大剂量二甲双胍诱导的小鼠早期腹泻, 为解决二甲双胍不耐受的临床问题提供了具有科学内涵的中西药联合用药解决方案。

关键词: 胃肠道不耐受; 二甲双胍; 黄芩苷; 肠道菌群; 胆汁酸; 肠屏障

中图分类号: R963　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0513-4870(2025)07-2246-08

Mechanism of baicalin in alleviating metformin-induced early diarrhea in mice *via* modulation of gut microbiota-bile acids-gut barrier

WANG Ai-ting[1,2], MIAO Zeng-hui[1,2], ZHANG Ying[1,2], LONG Jiang-lan[1,2], YAN Dan[1,2*]

(*1. Beijing Institute of Clinical Pharmacy, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China; 2. State Key Laboratory of Digestive Health, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China*)

Abstract: Metformin demonstrates significant hypoglycemic efficacy, yet its clinical application is limited by gastrointestinal adverse reactions. The integration of Chinese and Western medicine through gut microbiota modulation provides a novel strategy for addressing metformin intolerance. Animal experiments were approved by the Animal Ethics Committee of Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University (Approval No.: 23-2043).

收稿日期: 2025-05-30;　修回日期: 2025-06-12.

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (82204699); 首都卫生发展科研专项 (首发2022-4-20218); 吴阶平医学基金会临床科研专项 (320.6750.2023-03-16).

*通讯作者 E-mail: danyan@ccmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0617

C57BL/6J mice were fed a high-fat diet (HFD) for 4 weeks, followed by 7 days of high-dose metformin administration (250 mg·kg^{-1}, bid) to establish a diarrhea model (HFDM). Additional groups included a normal chow diet group (NCD), HFD group, and combination group (HFDMB; co-administered baicalin while establishing the mouse model of diarrhea, 100 mg·kg^{-1}, bid). Observations of fecal morphology, diarrhea score, and fecal water content revealed that baicalin alleviated metformin-induced early diarrhea. Full-length 16S rRNA sequencing of fecal samples demonstrated that baicalin reduced the relative abundance of diarrhea-associated bacteria (*Shigella sonnei*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus hirae*) while increasing beneficial bacteria (*Lactobacillus johnsonii*, *Ligilactobacillus murinus*, *Limosilactobacillus reuteri*). Targeted bile acid quantification of colonic contents revealed elevated levels of primary bile acids (e.g., TCDCA, TCA) in the HFDM group, which were normalized by baicalin co-treatment. Histopathological analysis of colonic tissues *via* H&E staining and immunohistochemical labeling of tight junction proteins (ZO-1 and occludin) indicated that baicalin mitigated metformin-induced colonic damage and enhanced tight junction protein expression. In conclusion, this study elucidates that baicalin alleviates metformin-induced early diarrhea by modulating gut microbiota-bile acids-gut barrier, offering a scientifically grounded integrated therapeutic approach for clinical metformin intolerance.

Key words: gastrointestinal intolerance; metformin; baicalin; gut microbiota; bile acids; gut barrier

二甲双胍作为经典的降糖药物, 具有降糖效果显著、安全性高、价格低廉等优点。然而, 服用二甲双胍的患者人群中, 存在20%～30%的患者会发生胃肠道不良反应, 主要为恶心、腹泻、呕吐等, 其中5%～10%难以耐受而停药, 极大限制了二甲双胍的临床应用[1]。面对二甲双胍不耐受, 临床解决办法主要为调整用药策略, 如从小剂量开始逐渐增大剂量、改用肠溶片/缓释片、餐中或餐后服药等, 若患者依然不耐受, 只能停药并更换为其他降糖药[2]。可见, 解决二甲双胍不耐受问题具有重要临床意义。

二甲双胍胃肠道不良反应发生机制包括以下几个方面: 二甲双胍不良反应可能与肠道菌群失衡, 特别是体内大肠杆菌的丰度增加有关[3]。进一步地, 肠道菌群组成或活性的失衡会影响体内胆汁酸平衡, 导致胃肠道不良反应[4]。部分患者胃肠道不良反应可能是由十二指肠黏膜内5-羟色胺和其他神经递质的释放导致的, 这些物质与恶心、呕吐、腹泻密切有关[5]。服用二甲双胍后总胰高血糖素样肽1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 水平升高, GLP-1具有抑制食欲、减缓胃排空的作用, 因此也可能会增加胃肠道不良反应[6]。二甲双胍增加了人体肠道中葡萄糖的摄取和利用, 随后肠细胞中乳酸生成的增加导致了二甲双胍不耐受[7]。质膜单胺转运蛋白、有机阳离子转运蛋白1是二甲双胍转运蛋白, 可影响局部二甲双胍浓度, 其功能的改变可能导致接受二甲双胍治疗的患者胃肠道不耐受风险升高[1,8]。二甲双胍抑制钠氢离子交换体3, 进而导致肠道吸水率降低、粪便含水量增加, 从而导致腹泻[9]。可见, 在二甲双胍不良反应发生机制中, 肠道菌群及其代谢物胆汁酸具有重要作用。

中药及其活性成分在调节肠道菌群、治疗胃肠道不良反应中优势显著。黄芩汤出自汉代张仲景的《伤寒论》, 由黄芩、芍药、甘草和大枣四味药组成, 用于治疗腹泻和腹部痉挛等胃肠道疾病。郑永齐教授团队采用标准化生产工艺保证黄芩汤质量一致性, 研发成抗肿瘤新药PHY906[10], 增强卡培他滨的抗肿瘤活性的同时, 可显著降低胃肠道不良反应[11]。黄芩汤与二甲双胍联合治疗2型糖尿病患者的降糖疗效显著, 且不良反应总发生率低, 与调节肠道菌群相关[12,13]。黄芩苷 (baicalin) 是黄芩汤中黄芩的主要活性成分和指标性成分, 占黄芩干燥品9.0%及以上[14], 具有抑菌、抗炎、降糖、抗肿瘤等作用[15-17], 临床上主要用于抗炎保肝。现代药理学研究表明, 黄芩苷多种药理作用的发挥与调节肠道菌群密切相关[18,19]。但黄芩苷能否通过调节肠道菌群缓解二甲双胍胃肠道不良反应尚不清楚。本项目建立大剂量二甲双胍诱导腹泻小鼠模型[20], 给予黄芩苷干预, 通过对小鼠腹泻情况观察与腹泻相关指标检测判断黄芩苷对二甲双胍引起的小鼠腹泻的治疗作用, 并从肠道菌群–胆汁酸–肠屏障角度分析黄芩苷作用机制, 为中西药联合用药解决二甲双胍胃肠道不耐受的临床问题提供科学依据。

材料与方法

药品与试剂 基础饲料 (normal chow diet, NCD, 货号: xT101FZ-010), 江苏省协同医药生物工程有限责任公司; 高脂饲料 (high-fat diet, HFD, 货号: D12492), 美国Research Diets公司; 盐酸二甲双胍 (货号: S30880), 上海源叶生物科技有限公司; 黄芩苷 (货号: BT-HQ03), 北京倍特仁康生物医药科技有限公司; 闭合带蛋白-1 (ZO-1) 一抗 (货号: GB111402)、闭合蛋白 (occludin) 一抗 (货号: GB111401) 和辣根过氧化物酶 (horseradish

peroxidase, HRP) 标记的二抗 (货号: GB23303), 武汉赛维尔生物科技有限公司。

实验动物 24只5周龄雄性SPF级C57BL/6J小鼠购自北京维通利华生物科技有限公司, 动物许可证号: SYXK (京) 2022-0022。饲养条件为: SPF环境、室温20～24 ℃、湿度40%～70%, 12 h明暗交替, 除特殊实验安排外自由饮食饮水。动物实验方案经首都医科大学附属北京友谊医院动物伦理委员会审查并获批准 (批准号: 23-2043)。

实验动物模型建立、给药及取材 小鼠适应性喂养1周后, 其中18只小鼠改用HFD喂养并持续至实验结束, 另6只小鼠继续NCD喂养至实验结束 (正常对照组, NCD)。HFD喂养4周建立糖耐量受损模型后, 随机分为高脂饮食组 (HFD)、腹泻模型组 (HFDM)、联合给药组 (HFDMB)。而后, 各组处理: NCD, 灌胃纯水, 每日2次, 连续7天; HFD, 灌胃纯水, 每日2次, 连续7天; HFDM, 灌胃二甲双胍水溶液 (250 mg·kg^{-1}), 每日2次, 连续7天; HFDMB, 灌胃二甲双胍水溶液 (250 mg·kg^{-1}) 和黄芩苷水溶液 (100 mg·kg^{-1}), 每日2次, 连续7天。

实验终点, 收集小鼠粪便, −80 ℃保存; 取材前一晚禁食不禁水12 h, 取材时先剪胡须以防止溶血, 摘眼球取血, 放入1.5 mL EP管, 室温放置1～2 h后4 ℃、3 000 r·min^{-1}离心10 min, 得血清, 分装后−80 ℃保存; 取结肠, 4%多聚甲醛固定; 取结肠内容物, −80 ℃保存。

粪便形态学观察 观察各组小鼠粪便形态并拍照记录。

粪便含水量检测 二甲双胍灌胃后第1～6天每天检测粪便含水量[4]。取新鲜粪便收集至样品管, 称量湿重, 105 ℃干燥24 h至恒重再次称重, 计算粪便含水量。粪便含水量 (%) = [(湿重−干重)/湿重]×100%。

腹泻评分 二甲双胍灌胃后第1～6天每天进行腹泻评分。腹泻评分标准[21]: ① 无腹泻, 正常粪便, 评分为0分; ② 轻度腹泻, 大便微湿软, 评分为1分; ③ 中度腹泻, 未成形的粪便, 评分为2分; ④ 严重腹泻, 水样粪便, 评分为3分。

全长16S rRNA测序 小鼠粪便经核酸提取、核酸质量检测、文库建库、高通量测序、生物信息学分析, 进行微生物多样性分析。

胆汁酸靶向定量 取50 mg小鼠结肠内容物, 加200 μL超纯水超声破碎10 min, 甲醇提取1 h后, 4 ℃、12 000 r·min^{-1}离心10 min。取上清液100 μL至液相小瓶 (内含250 μL内插管), 加入10 μL混合内标溶液 [含胆酸 (cholic acid, CA)-[d_4]、石胆酸 (lithocholic acid, LCA)-[d_4]、熊去氧胆酸 (ursodeoxycholic acid, UDCA)-[d_4]、鹅去氧胆酸 (chenodeoxycholic acid, CDCA)-[d_4]、甘氨胆酸 (glycocholic acid, GCA)-[d_4]、牛磺熊去氧胆酸 (tauroursodeoxycholic acid, TUDCA)-[d_4], 浓度均为2 μg·mL^{-1}], 混匀待测。采用ACQUITY UPLC I-Class超高效液相色谱进行色谱分离, 色谱柱: Waters UPLC HSS T3 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm); 流动相: A相 (水∶乙腈 = 10∶1, 0.04%乙酸, 1 mmol·L^{-1}乙酸铵), B相 (乙腈∶异丙醇 = 1∶1); 梯度洗脱模式。采用XEVO TQ-XS串联四级杆质谱系统进行质谱分析, 负离子模式, 离子源电压−2 kV、去溶剂化温度500 ℃、锥孔电压−21 V。Targetlynx软件计算峰面积 (保留时间误差±15 s), 标准曲线法定量。

组织病理分析 取经4%多聚甲醛固定的结肠组织, 经脱水、透明化、浸蜡、包埋后, 使用切片机将蜡块切成4～6 μm厚的切片, 贴附于载玻片上。切片经脱蜡−水化, 放入苏木精染液染色5～10 min, 冲洗、分化、蓝化, 再放入伊红染液中染色1～3 min, 冲洗、脱水、透明化, 封片。染色后的切片用数字扫描仪扫描, 采用CaseViewer 2.3观察。

免疫组化染色 石蜡切片经脱蜡−水化、抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、血清封闭后, 加一抗 (ZO-1、occludin) 孵育过夜, 清洗, 加HRP标记的二抗孵育1 h, 清洗, 加DAB显色, 阳性为棕黄色, 水冲洗终止显色。苏木素复染细胞核, 脱水封片, 用数字扫描仪扫描, 采用CaseViewer 2.3观察, ImageJ定量分析。

数据处理与分析 采用GraphPad Prism 9.0软件对数据进行统计分析, 数据以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。对数据进行Shapiro-Wilk检验判断数据是否符合正态分布。对于两组且服从正态分布的数据, 若方差齐性, 采用非配对 t 检验, 若方差不齐, 采用Welch's校正非配对 t 检验; 对于两组且不服从正态分布的数据, 采用Mann-Whitney秩和检验。对于多组数据, 采用单因素方差分析。$P < 0.05$ 认为存在统计学差异。

结果

1 黄芩苷缓解大剂量二甲双胍引起的小鼠早期腹泻

根据对小鼠粪便形态的观察 (图1A), 发现对照组 (NCD组) 小鼠粪便为棕褐色颗粒状, 高脂饮食喂养组 (HFD组) 小鼠粪便呈现蓝绿色 (高脂饲料颜色) 颗粒状, 日剂量500 mg·kg^{-1}二甲双胍灌胃的小鼠 (HFDM组) 粪便黄绿色、维持基本形态但质地松软、部分粪便为半固体状态, 黄芩苷与二甲双胍联合用药组 (HFDMB组) 小鼠粪便为黄褐色颗粒状。小鼠腹泻评分结果显示 (图1B), NCD组与HFD组小鼠腹泻评分在1～6天均维持在最低水平; 与HFD组相比, HFDM组腹泻评分显著升高, 且服用二甲双胍早期腹泻评分更高; 加用

黄芩苷 (HFDMB组与HFDM组相比) 小鼠腹泻评分显著降低。小鼠粪便含水量检测结果显示 (图1C), HFDM组与HFD组相比, 灌胃二甲双胍后第1～6天小鼠粪便含水量均显著增加, 且早期 (第1～3天) 两组差异更为显著; HFDMB组与HFDM组相比, 第2～3天小鼠粪便含水量显著降低。以上结果提示, 日剂量500 mg·kg^{-1}灌胃二甲双胍后1～6天内均可引起小鼠腹泻, 黄芩苷可缓解大剂量二甲双胍引起的小鼠早期腹泻。

2 黄芩苷和二甲双胍对小鼠肠道菌群的调节作用

小鼠粪便肠道菌群属分类水平物种分布排名前20的菌属结果显示 (图2A, 图3A、B), NCD组显著富集阿克曼氏菌属 *Akkermansia*、杜博西氏菌属 *Dubosiella*; HFD组显著富集粪杆菌属 *Faecalibaculum*; 与HFD组相比, HFDM组埃希氏菌–志贺氏菌属 *Escherichia Shigella*、肠球菌属 *Enterococcus* 相对丰度增加, 而HFDMB组可抑制二甲双胍引起的上述两属菌相对丰度的增加, 同时, HFDMB组富集乳杆菌属 *Lactobacillus*、利吉乳杆菌属 *Ligilactobacillus*、利莫乳杆菌属 *Limosilactobacillus*。种分类水平物种分布排名前30的菌种结果显示 (图2B, 图3C～H), HFDM组与腹泻正相关的索氏志贺氏菌 *Shigella sonnei*、鸡肠球菌 *Enterococcus gallinarum*、海氏肠球菌 *Enterococcus hirae* 相对丰度增加, 而HFDMB组可抑制二甲双胍引起的上述菌种相对丰度的增加, 同时, HFDMB组富集有益菌约氏乳杆菌 *Lactobacillus johnsonii*、鼠乳杆菌 *Ligilactobacillus murinus*、罗伊氏黏液乳杆菌 *Limosilactobacillus reuteri*。

3 黄芩苷和二甲双胍调控小鼠结肠内容物胆汁酸谱

对小鼠结肠内容物进行胆汁酸靶向定量检测。聚类热图结果显示 (图4A), 不同组别小鼠胆汁酸谱呈现不同特征。高脂饮食 (HFD组与NCD组相比) 使小鼠结肠内容物 α-鼠胆酸 (α-muricholic acid, αMCA)、βMCA、GCA、CA、UDCA、CDCA 含量增加; 大剂量二甲双胍 (HFDM组与HFD组相比) 显著改变胆汁酸谱, 体现在初级胆汁酸牛磺鹅去氧胆酸 (taurochenodeoxycholic acid, TCDCA)、牛磺胆酸 (taurocholic acid, TCA) 显著升高、牛磺-α-鼠胆酸/牛磺-β-鼠胆酸 (tauro-α-muricholic acid/tauro-β-muricholic acid, TαMCA/TβMCA) 升高, 而次级胆汁酸甘氨猪去氧胆酸 (glycohyodeoxycholic acid, GHDCA)、猪去氧胆酸 (hyodeoxycholic acid, HDCA)、牛磺去氧胆酸 (taurodeoxycholic acid, TDCA)、脱氧胆酸 (deoxycholic acid, DCA)、LCA降低, 黄芩苷与二甲双胍合用使初级胆汁酸TCDCA、TCA、TαMCA/TβMCA降低 (图4B～D)。

4 黄芩苷改善大剂量二甲双胍引起的小鼠肠屏障损伤

实验终点小鼠结肠组织H&E染色、免疫荧光标记紧密连接蛋白结果显示 (图5A), HFD组与NCD组相比, 表面柱状上皮细胞排列稍紊乱、杯状细胞数量减少、隐窝深度缩短、紧密连接蛋白ZO-1显著降低 (图5B); 大剂量二甲双胍进一步加剧上述结肠指标恶化 (HFDM组与HFD组相比); 黄芩苷可改善小鼠结肠组织损伤, 体现在结肠H&E染色切片正常化、紧密连接蛋白ZO-1和闭合蛋白显著升高 (图5B、C)。

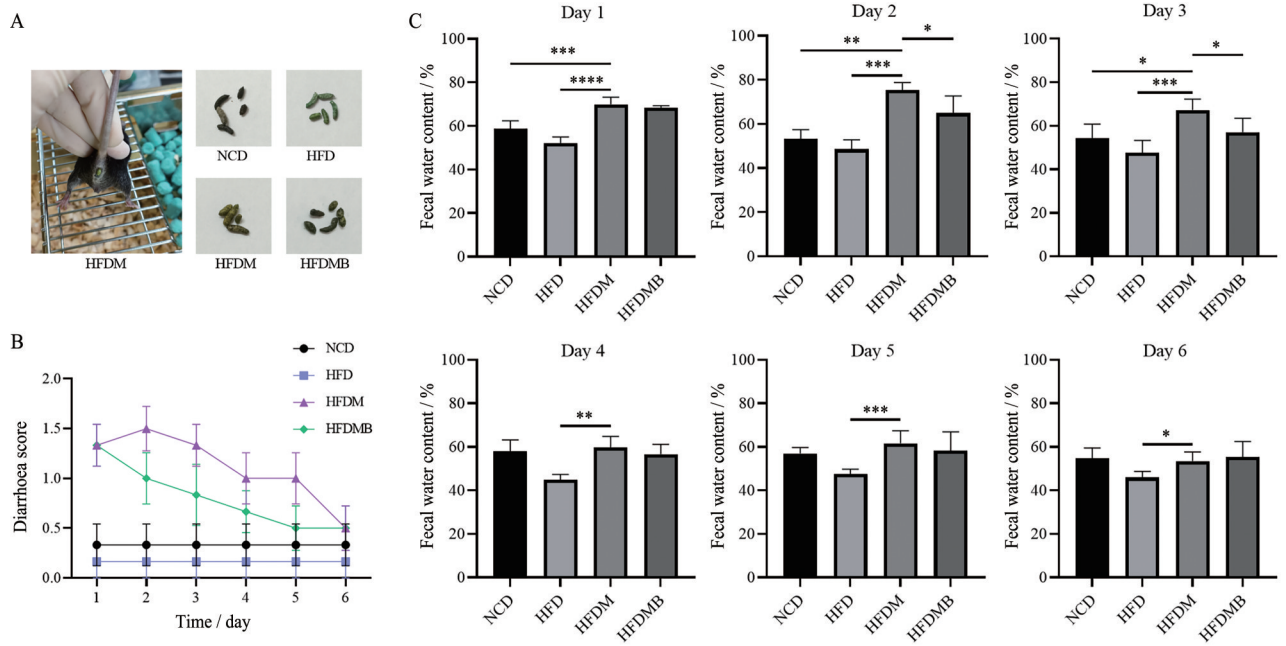


Figure 1 Effects of baicalin on metformin-induced diarrhea in mice. A: Representative photographs showing the fecal morphology of mice from different groups; B: Diarrhea score in mice; C: Fecal water content in mice. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.000\,1$

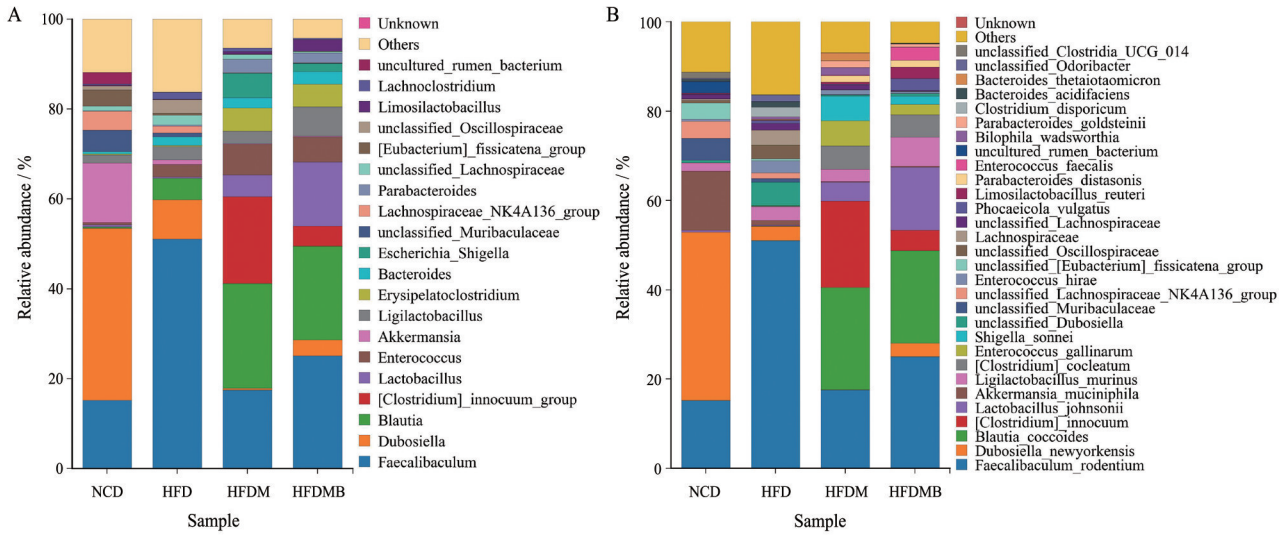


Figure 2 Effects of baicalin and metformin on the gut microbiota in mice. A: The relative abundance of the top 20 microbial communities at genus level abundance ranking; B: The relative abundance of the top 30 microbial communities at species level abundance ranking

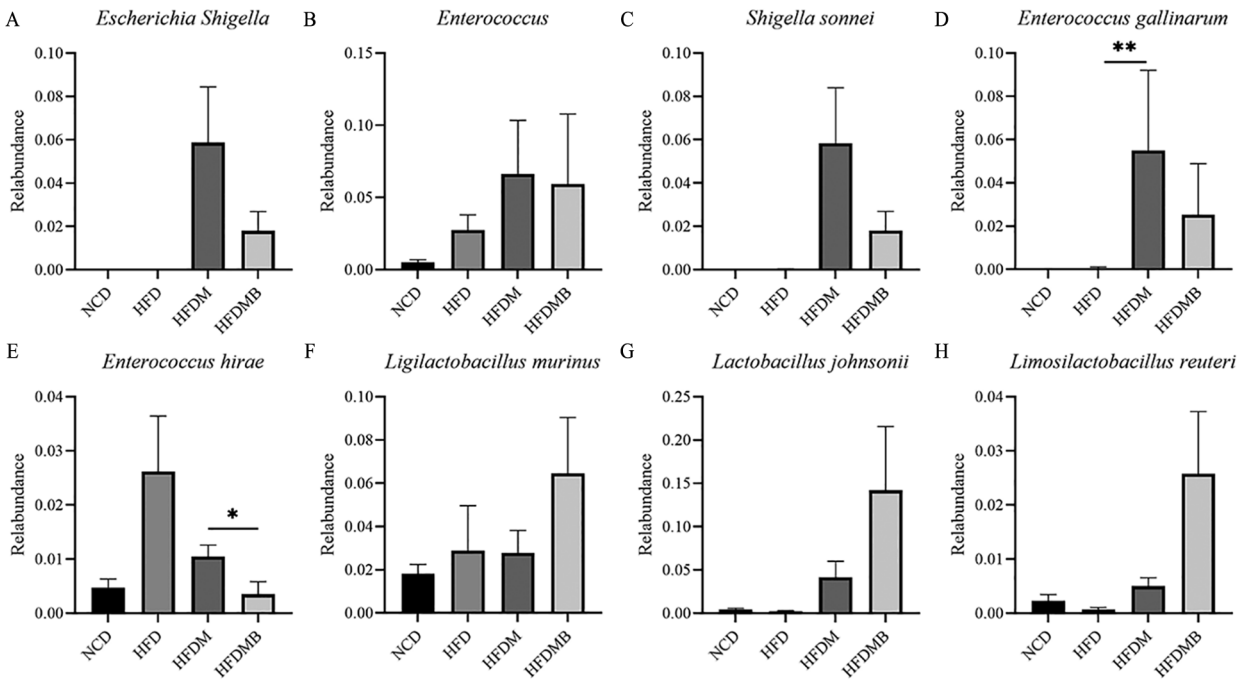


Figure 3 Quantification of the relative abundance of specific bacteria in different groups of mice. A: *Escherichia Shigella*; B: *Enterococcus*; C: *Shigella sonnei*; D: *Enterococcus gallinarum*; E: *Enterococcus hirae*; F: *Ligilactobacillus murinus*; G: *Lactobacillus johnsonii*; H: *Limosilactobacillus reuteri*. $n = 6, \bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

讨论

本研究通过灌胃大剂量二甲双胍建立腹泻小鼠模型, 并首次揭示黄芩苷通过调控菌群−胆汁酸−肠屏障三重机制缓解大剂量二甲双胍引起的小鼠早期腹泻。

在药效表型层面, 通过给小鼠大剂量灌胃二甲双胍, 构建二甲双胍腹泻模型。腹泻相关指标即粪便形态、腹泻评分、粪便含水量均显示二甲双胍诱导的小鼠腹泻模型构建成功, 并且呈现早期加重、后逐步减轻的趋势, 与临床患者服用二甲双胍发生胃肠道不良反应特征类似[22]。黄芩苷对二甲双胍诱导的腹泻最严重阶段, 即早期腹泻, 有显著的抑制作用。有研究表明, 黄芩苷发挥抗菌、抗炎、免疫调节作用, 抑制轮状病毒引起的儿童或新生儿腹泻和肠胃炎[23]; 黄芩汤可改善伊立替康相关性腹泻, 机制与黄芩素破坏大肠杆菌细胞壁抑制其增殖、黄芩苷和黄芩素显著抑制β-葡萄糖醛酸酶活性有关[24]; 葛根芩连汤也是治疗腹泻的经验方,

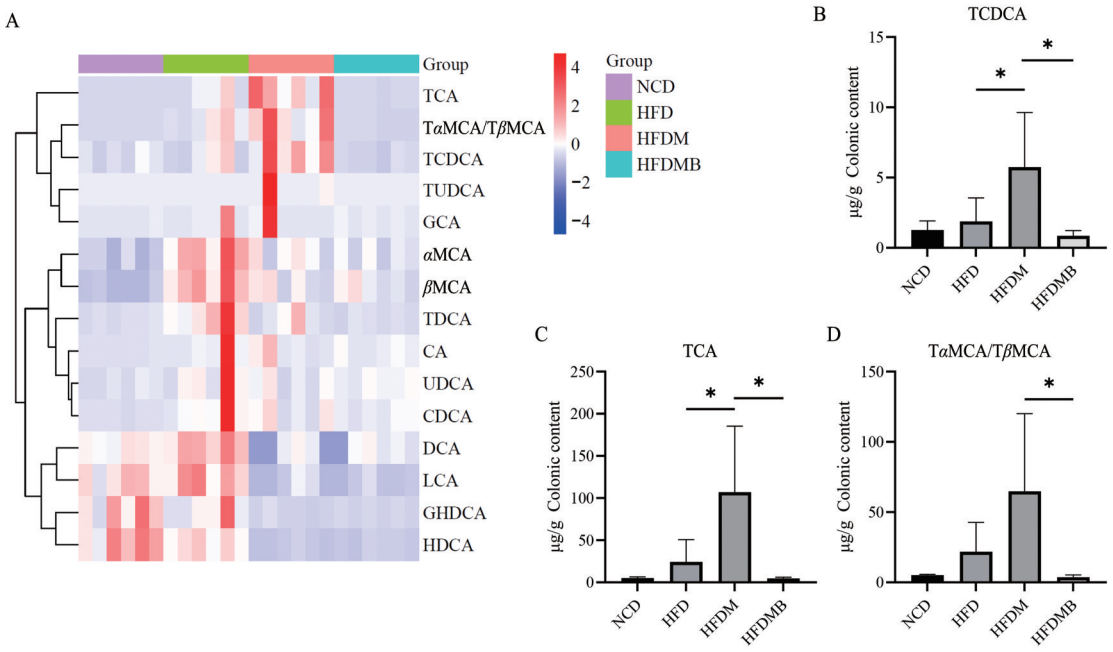


Figure 4 Quantificaiton of bile acid contents in mouse colon. A: Heatmap showing difference of 15 individual bile acids in the colonic content of four grouped mice; B: Level of taurochenodeoxycholic acid (TCDCA) in mouse colon; C: Level of taurocholic acid (TCA) in mouse colon; D: Level of tauro-*α*-muricholic acid/tauro-*β*-muricholic acid (T*α*MCA/T*β*MCA) in mouse colon. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$

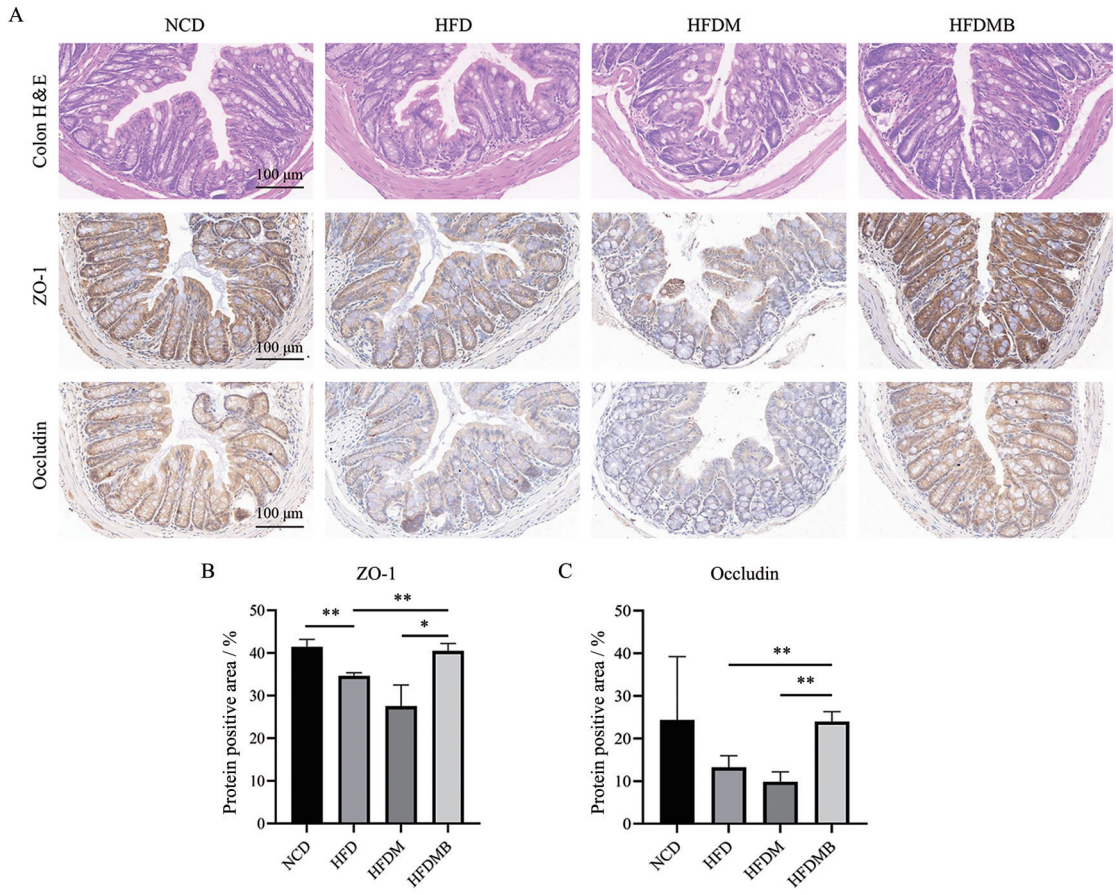


Figure 5 Colonic histopathology and tight junction protein expression in mice. A: Histopathological evaluation and immunohistochemical localization of tight junction proteins zonula occludens-1 (ZO-1) and occludin in colon tissues; B and C: Quantitative analysis of ZO-1 and occludin expression, respectively. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

机制与调节肠道菌群有关, 而黄芩苷是其主要活性成分[25]。以上证据支持本研究黄芩苷缓解二甲双胍引起的小鼠腹泻表型具有合理性。

在菌群层面, 联用黄芩苷降低的索氏志贺氏菌 *Shigella sonnei* 是志贺氏菌属 *Shigella* 的一个种, 可导致肠道特别是结肠部位感染, 是腹泻的主要病原体[26], 而提升的鼠乳杆菌 *Ligilactobacillus murinus* 是肠道益生菌, 能通过分泌胞外囊泡诱导巨噬细胞从促炎的M1表型向抗炎的M2表型转化, 发挥肠屏障保护作用[27]。此外, 高脂饮食组显著富集鸡肠球菌 *Enterococcus gallinarum*, 该表型与其他研究一致[28], 并且该菌是一种减少肠道黏液和紧密连接蛋白表达的细菌, 可以促进细菌移位, 与本研究HFD组紧密连接蛋白ZO-1降低一致; 该菌株也被证实能诱发Th17细胞介导的肠道炎症[29]; 本研究中黄芩苷对鸡肠球菌有下调趋势。黄芩苷对同属的海氏肠球菌 *Enterococcus hirae* 具有显著抑制作用, 该菌被报道与新生仔猪、大鼠腹泻有关[30,31]。以上菌群层面证据与大剂量二甲双胍诱发小鼠腹泻、黄芩苷缓解小鼠早期腹泻表型高度吻合。

在胆汁酸代谢方面, 胆汁酸与腹泻存在明确关联, 且初级胆汁酸与次级胆汁酸对腹泻的影响机制存在差异。过量未被回肠吸收的胆汁酸进入结肠后, 会增加结肠黏液分泌、加速肠道运动, 并破坏黏膜屏障, 导致水样便和排便频率增加。初级胆汁酸由肝脏直接合成 (如CA、CDCA), 其非结合形式对肠道刺激性更强。研究发现腹泻患者粪便中初级胆汁酸比例显著升高, 可能与肠道菌群失调导致次级转化不足有关[32]。次级胆汁酸由肠道细菌分解初级胆汁酸生成 (如DCA、LCA), 刺激性较弱。腹泻发生时, 次级胆汁酸比例通常降低, 同时结合型胆汁酸 (与甘氨酸或牛磺酸结合) 减少, 进一步加剧肠道刺激。本研究发现TCDCA、TCA等初级胆汁酸在HFDM组升高、在HFDMB组降低, 与上述报道一致。然而, 也有研究表明次级胆汁酸DCA、HDCA和LCA是引发胆囊切除术后腹泻的关键, 并且与刺激5-羟色胺、增加肠道蠕动有关[4]。

肠屏障由四大防御体系构成[33]: 由肠上皮细胞及其紧密连接蛋白构成的机械屏障; 由肠上皮黏液层, 含抗菌肽、胆汁酸等成分构成的化学屏障; 由乳酸杆菌、双歧杆菌等益生菌为主构成的生物屏障, 以及由肠道相关淋巴组织分泌免疫球蛋白A等免疫因子构成的免疫屏障。本研究发现黄芩苷可缓解大剂量二甲双胍诱导的小鼠早期腹泻, 与调节肠道菌群与胆汁酸谱有关, 在进一步对小鼠结肠组织病理分析与紧密连接蛋白表达检测后, 发现黄芩苷可改善二甲双胍引起的小鼠肠屏障损伤。

现行临床处理二甲双胍腹泻等不良反应多采用渐进给药或更换剂型的方式, 前者因二甲双胍剂量不足会影响降糖效果, 后者很可能依然存在腹泻等胃肠道不良反应。本方案中黄芩苷可改善大剂量二甲双胍引起的小鼠早期腹泻。特别值得注意的是, 以黄芩苷为唯一活性成分的黄芩苷胶囊是上市药物, 用于急、慢性肝炎、迁延性肝炎的辅助治疗。本研究黄芩苷日给药剂量为200 mg·kg^{-1}, 与临床用药剂量 (黄芩苷胶囊, 0.25 g/粒, 一次2粒, 一日3次) 换算为小鼠剂量相当, 且文献中黄芩苷小鼠给药剂量多为10～200 mg·kg^{-1} [34], 尚无研究报道黄芩苷存在安全性问题, 一些研究还显示黄芩苷或黄芩与二甲双胍合用, 有降低血糖、改善血脂的作用[35,36]。本研究发现的黄芩苷改善二甲双胍引起的腹泻与机制阐释, 以及黄芩苷联用二甲双胍安全性良好和潜在的血糖血脂获益, 均为后续临床试验的开展乃至新药研发提供了科学依据与坚实基础。

本研究存在局限: 未明确黄芩苷调控的肠道菌、胆汁酸是否可改善二甲双胍引起的小鼠腹泻; 仅为单一雄性动物模型下的实验结果。后续研究可结合无菌小鼠菌群移植实验、代谢物功能验证实验、不同动物模型, 完善黄芩苷缓解二甲双胍腹泻的生物学机制; 从转化医学角度, 可以开展黄芩苷联合二甲双胍对2型糖尿病患者的降糖疗效与不良反应的影响研究。

作者贡献: 王爱婷负责实验研究过程、数据分析与论文撰写; 苗增慧负责实验研究过程; 张颖负责实验研究过程; 龙江兰负责数据分析; 鄢丹提出研究思路、设计方案并修改论文。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

[1] Dawed AY, Zhou K, van Leeuwen N, et al. Variation in the plasma membrane monoamine transporter (PMAT) (encoded by *SLC29A4*) and organic cation transporter 1 (OCT1) (encoded by *SLC22A1*) and gastrointestinal intolerance to metformin in type 2 diabetes: an IMI DIRECT study [J]. Diabetes Care, 2019, 42: 1027-1033.

[2] Expert Group for Updating Chinese Expert Consensus on Metformin in Clinical Practice. Chinese expert consensus on metformin in clinical practice: 2023 update [J]. Int J Endocrinol Metab (国际内分泌代谢杂志), 2023, 43: 345-356.

[3] Forslund K, Hildebrand F, Nielsen T, et al. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota [J]. Nature, 2015, 528: 262-266.

[4] Xu Y, Wang J, Wu X, et al. Gut microbiota alteration after cholecystectomy contributes to post-cholecystectomy diarrhea *via* bile acids stimulating colonic serotonin [J]. Gut Microbes, 2023, 15: 2168101.

[5] Yee SW, Lin L, Merski M, et al. Prediction and validation of enzyme and transporter off-targets for metformin [J]. J Pharma-

cokinet Pharmacodyn, 2015, 42: 463-475.

[6] Filippatos TD, Panagiotopoulou TV, Elisaf MS. Adverse effects of GLP-1 receptor agonists [J]. Rev Diabet Stud, 2014, 11: 202-230.

[7] Defronzo R, Fleming GA, Chen K, et al. Metformin-associated lactic acidosis: current perspectives on causes and risk [J]. Metabolism, 2016, 65: 20-29.

[8] Li S, Xu B, Fan S, et al. Effects of single-nucleotide polymorphism on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of metformin [J]. Expert Rev Clin Pharmacol, 2022, 15: 1107-1117.

[9] Han Y, Yun CC. Metformin inhibits Na^+/H^+ exchanger NHE3 resulting in intestinal water loss [J]. Front Physiol, 2022, 13: 867244.

[10] Liu S, Cheng Y. Old formula, new Rx: the journey of PHY906 as cancer adjuvant therapy [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 140: 614-623.

[11] Changou CA, Shiah H, Chen L, et al. A phase II clinical trial on the combination therapy of PHY906 plus capecitabine in hepatocellular carcinoma [J]. Oncologist, 2021, 26: e367-e373.

[12] Dong MX, Yang SS, Tu H. Clinical effect of Huangqin decoction combined with metformin in the treatment of type 2 diabetes mellitus and its influence on intestinal flora composition of patients [J]. Clin Res Pract (临床医学研究与实践), 2022, 7: 128-130.

[13] Cao M, Xue J, Dong QJ, et al. Effect of Huangqin decoction and metformin on intestinal flora and insulin signal transduction molecular in diabetes [J]. Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊), 2019, 37: 2792-2795.

[14] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [M]. Vol I. 2025 Ed. Beijing: China Medical Science Press, 2025: 323.

[15] Zhu Z, Yu M, Xu M, et al. Baicalin suppresses macrophage JNK-mediated adipose tissue inflammation to mitigate insulin resistance in obesity [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 332: 118355.

[16] Zhang S, Tang S, Liu Z, et al. Baicalin restore intestinal damage after early-life antibiotic therapy: the role of the MAPK signaling pathway [J]. Pharmacol Res, 2024, 204: 107194.

[17] Dong X, Liu X, Lin D, et al. Baicalin induces cell death of non-small cell lung cancer cells *via* MCOLN3-mediated lysosomal dysfunction and autophagy blockage [J]. Phytomedicine, 2024, 133: 155872.

[18] Zhang Y, Liu XJ, Zhao W, et al. Baicalin circumvents anti-PD-1 resistance by regulating the gut microbiota metabolite short-chain fatty acids [J]. Pharmacol Res, 2024, 199: 107033.

[19] Ganguly R, Gupta A, Pandey AK. Role of baicalin as a potential therapeutic agent in hepatobiliary and gastrointestinal disorders: a review [J]. World J Gastroenterol, 2022, 28: 3047-3062.

[20] Takemori H, Hamamoto A, Isogawa K, et al. Mouse model of metformin-induced diarrhea [J]. BMJ Open Diabetes Res Care, 2020, 8: e898.

[21] Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, et al. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota [J]. Nature, 2013, 500: 232-236.

[22] Bonnet F, Scheen A. Understanding and overcoming metformin gastrointestinal intolerance [J]. Diabetes Obes Metab, 2017, 19: 473-481.

[23] Shen J, Chen J, Zhang B, et al. Baicalin is curative against rotavirus damp heat diarrhea by tuning colonic mucosal barrier and lung immune function [J]. Dig Dis Sci, 2020, 65: 2234-2245.

[24] Teng X, Wu B, Liang Z, et al. Three bioactive compounds from Huangqin decoction ameliorate irinotecan-induced diarrhea *via* dual-targeting of *Escherichia coli* and bacterial β-glucuronidase [J]. Cell Biol Toxicol, 2024, 40: 88.

[25] Liu C, Liang X, Wei X, et al. Gegen Qinlian decoction treats diarrhea in piglets by modulating gut microbiota and short-chain fatty acids [J]. Front Microbiol, 2019, 10: 825.

[26] Scott TA, Baker KS, Trotter C, et al. *Shigella sonnei*: epidemiology, evolution, pathogenesis, resistance and host interactions [J]. Nat Rev Microbiol, 2025, 23: 303-317.

[27] Fan J, Zhang Y, Zuo M, et al. Novel mechanism by which extracellular vesicles derived from *Lactobacillus murinus* alleviates deoxynivalenol-induced intestinal barrier disruption [J]. Environ Int, 2024, 185: 108525.

[28] Xiong L, Diwakarla S, Chatzis R, et al. Acute exposure to high-fat diet impairs ILC3 functions and gut homeostasis [J]. Immunity, 2025, 58: 1185-1200.

[29] Gronke K, Nguyen M, Fuhrmann H, et al. Translocating gut pathobiont *Enterococcus gallinarum* induces T_H17 and IgG3 anti-RNA-directed autoimmunity in mouse and human [J]. Sci Transl Med, 2025, 17: eadj6294.

[30] Etheridge ME, Yolken RH, Vonderfecht SL. *Enterococcus hirae* implicated as a cause of diarrhea in suckling rats [J]. J Clin Microbiol, 1988, 26: 1741-1744.

[31] Larsson J, Lindberg R, Aspan A, et al. Neonatal piglet diarrhoea associated with enteroadherent *Enterococcus hirae* [J]. J Comp Pathol, 2014, 151: 137-147.

[32] Zhan K, Wu H, Xu Y, et al. The function of the gut microbiota-bile acid-TGR5 axis in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. mSystems, 2024, 9: e129923.

[33] Martel J, Chang S, Ko Y, et al. Gut barrier disruption and chronic disease [J]. Trends Endocrinol Metab, 2022, 33: 247-265.

[34] Hu Q, Zhang W, Wu Z, et al. Baicalin and the liver-gut system: pharmacological bases explaining its therapeutic effects [J]. Pharmacol Res, 2021, 165: 105444.

[35] Shin N R, Gu N, Choi HS, et al. Combined effects of *Scutellaria baicalensis* with metformin on glucose tolerance of patients with type 2 diabetes *via* gut microbiota modulation [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2020, 318: E52-E61.

[36] Waisundara VY, Hsu A, Tan B K, et al. Baicalin improves antioxidant status of streptozotocin-induced diabetic Wistar rats [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57: 4096-4102.