

地黄叶对糖尿病肾病大鼠肠道菌群的调节作用

戴新新, 蔡红蝶, 宿树兰*, 郑天瑶, 魏丹丹, 严 辉, 朱 悦, 钱大玮, 段金厥*

(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, 中药资源产业化与方剂创新药物
国家地方联合工程研究中心, 国家中医药管理局中药资源循环利用重点研究室, 江苏 南京 210023)

摘要: 研究地黄叶总苷提取物及地黄叶总苷胶囊对糖尿病肾病大鼠肠道菌群的调节作用。将 48 只大鼠随机分为正常组 (C)、模型组 (M)、黄葵胶囊组 ($0.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, HK)、厄贝沙坦组 ($27 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, YX)、地黄叶总苷提取物低剂量组 ($4.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, DHYL)、地黄叶总苷提取物高剂量组 ($7.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, DHYH)、地黄叶总苷胶囊低剂量组 ($216 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, JNL) 和地黄叶总苷胶囊高剂量组 ($360 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, JNH), 每组 6 只。除正常组外, 其余各组采用高糖高脂饲料+5% 葡萄糖饮水+注射链脲佐菌素 ($45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, STZ) 的方法复制糖尿病肾病模型。造模成功后, 各组药物给药 2 周, 通过 16S rDNA 测序的方法研究地黄叶总苷提取物和地黄叶总苷胶囊对糖尿病肾病大鼠肠道菌群的调节作用。结果表明, 与正常组相比, 糖尿病肾病模型组大鼠肠道内菌群从门水平到属水平均发生了显著变化; 且模型组大鼠肠道菌中乳酸杆菌属比例显著降低; 给药后乳酸杆菌属比例有所回升, 尤其是厄贝沙坦组、地黄叶总苷提取物低剂量组和地黄叶总苷胶囊低剂量组调节作用较为显著。可见, 地黄叶总苷具有改善 STZ 诱导的糖尿病肾病大鼠肠道菌群失调的作用。

关键词: 地黄叶; 总苷; 糖尿病肾病; 肠道菌群

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 11-1683-09

Regulatory effect of the leaves of *Rehmannia glutinosa* Libosch on intestinal microflora in diabetic nephropathy rats

DAI Xin-xin, CAI Hong-die, SU Shu-lan*, ZHENG Tian-yao, WEI Dan-dan, YAN Hui,
ZHU Yue, QIAN Da-wei, DUAN Jin-ao*

(Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, State Administration of Traditional Chinese Medicine Key Laboratory of Chinese Medicinal Resources Recycling Utilization, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the regulatory effect of the total glycoside extracted from leaves of *Rehmannia* (TLR) and Dihuangye total glycoside capsule (DTG) on intestinal microflora in diabetic nephropathy rats. Forty-eight rats were randomly divided into the control group (C), model group (M), Huangkuai capsule group ($0.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, HK), irbesartan group ($27 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, YX), TLR low dose group ($4.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, DHYL), TLR high dose group ($7.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, DHYH), DTG low dose group ($216 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, JNL), DTG high dose group ($360 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, JNH). Rat model of diabetic nephropathy was induced by intraperitoneal injection of small dose of streptozotocin ($45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, STZ) and feeding high-fat diet and 5% glucose drinking water. After oral administration for two weeks, the 16S rDNA sequencing method was used to study the effects

收稿日期: 2017-06-01; 修回日期: 2017-06-29.

基金项目: 江苏省方剂高技术研究重点实验室建设项目 (BM2010578); 江苏省中药学优势学科 II 期建设项目 (ysxk-2014); 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心重点项目 (ZDXM-3-7); 江苏省“333 高层次人才培养工程”资助项目 (BRA2015391).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-25-85811917, E-mail: sushulan1974@163.com; dja@njucm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0528

of the TLR and DTG on intestinal flora in diabetic nephropathy rats. The results showed that compared with the control group, the intestinal flora of diabetic nephropathy rats had changed from phylum units to the genus units. Moreover, the proportion of lactobacilli in the intestinal bacteria of the model group was significantly decreased, and the proportion of lactobacilli in the administration group was increased, especially the YX group, TLR low dose group and DTG low dose group. The data suggest that the total glycosides of *Rehmannia glutinosa* improved the disorder of intestinal flora in STZ-induced diabetic nephropathy rats.

Key words: leave of *Rehmannia glutinosa* Libosch; total glycoside; diabetic nephropathy; gut microbiota

地黄为玄参科植物地黄 (*Rehmannia glutinosa* Libosch.) 的新鲜或干燥块根, 具有清热生津之功效^[1]。研究表明, 地黄叶中主要含有环烯醚萜苷类化合物梓醇及苯乙醇苷类化合物毛蕊花糖苷。近年来, 随着对地黄的深入研究, 人们逐渐开始关注对地黄叶的开发利用, 以期发现其入药的可能。目前, 地黄叶已被收载于1988年版《北京市中药材标准》^[2]: “地黄叶苦、寒, 归心、肝、肾经, 清热, 活血, 益气养阴, 补肾, 用于少气乏力, 面色无华, 口干咽燥, 气阴两虚证, 外用于恶疮, 手足癣”。地黄叶总苷胶囊主要药效成分为从地黄叶中提取的苯乙醇苷类^[3], 具有滋阴补肾、凉血活血之功, 能够使肾小球通透性增高, 减轻肾小球的高滤过, 从而有减少蛋白尿和保护肾功能的作用, 适用于慢性肾小球肾炎轻症属气阴两虚者。

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病患者最常见的微血管病变范畴, 在多种炎症因子的作用下, DN 患者出现肾脏纤维化, 最终导致肾功能衰竭, 也是糖尿病患者的主要死亡原因之一^[4]。肠道微生物作为数量庞大、种类繁多的微小生命体对人类健康具有重要意义, 肠道细菌在肥胖、糖尿病和心血管疾病等疾病中起着重要作用^[5]。大量研究表明, 糖尿病与肠道菌群的种类与数量存在一定的关系。相比正常人, 糖尿病患者体内的益生菌数量则明显减少, 即肠道益生菌的数量对改善血糖水平有一定作用^[6]。因此, 肠道菌群的调控已经成为一系列代谢性疾病防控的新方向。

本文在建立糖尿病肾病大鼠模型的基础上, 通过16S rDNA测序的方法研究评价地黄叶总苷提取物和地黄叶总苷胶囊对糖尿病肾病大鼠肠道菌群的调节作用, 以从肠道微环境的角度揭示地黄叶总苷改善糖尿病肾病的作用机制及科学内涵。

材料与方法

仪器与设备 RS232G 紫外分光光度计 (Eppendorf 公司); DYY-6C 电泳仪, PCR 仪 2720, 凝胶成像系统,

台式紫外分析仪 (BG 公司); Agilent, 2100, BioTek, FLx800, Promega, QuantiFluorTBS380 (Agilent 公司); Illumina Miseq 高通量测序仪 (Illumina 公司); 三诺血糖仪 GA-3 型及血糖试纸 (三诺公司); Acquity™ UPLC 超高效液相色谱系统, Xevo™ TQ 质谱系统和 Masslynx 4.1 质谱工作站软件 (美国 Waters 公司)。

实验动物 SD 大鼠, 雄性, 体质量 (220±20) g, 购自浙江省实验动物中心, 动物许可证号: SCXK (浙 2014-0001), 动物房温度 (22±2) °C, 湿度 (55±10) %, 12 h 明暗交替。

药品与试剂 地黄叶 (产地河南, 经段金廛教授鉴定为玄参科多年生草本地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥叶); 厄贝沙坦片购自赛诺菲 (杭州) 制药有限公司 (批号: 5A394); 黄葵胶囊购自江苏苏中药业集团股份有限公司 (批号: 16060216); 地黄叶总苷胶囊购自四川美大康药业股份有限公司 (批号: 150802); 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 购自美国 Sigma 公司; 毛蕊花糖苷 (acteoside, 批号 16012703, 质量分数 99.57%)、梓醇 (catalpol, 批号 15071603, 质量分数 98.90%) (中国食品药品检定研究院); 血清尿素氮 (serum urea nitrogen, BUN) 试剂盒、血肌酐 (serum creatinine, Scr) 试剂盒和尿蛋白 (urine protein, UP) 试剂盒购自南京建城生物工程有限公司; 琼脂糖 (英杰公司, 75510-019); EB-溴化乙锭清除液 (生工生物工程有限公司, EX328); PowerSoil® DNA 提取试剂盒 (美国 MoBio 公司, 12888); 5* 反应缓冲液, 脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTP, 10 mmol·L⁻¹), 5* High GC Buffer (美国 Sigma 公司); Axy Prep DNA Gel Extration 试剂盒 (美国 Axygen 公司, AP-GX-500); TruSeq Nano DNA LT Sample Prep 试剂盒 (武汉锦奥生物科技有限公司, FC-121-4001 或 FC-121-4002); Agencourt AMPure XP Beads 试剂盒 (美国 Beckman Coulter 公司, A63881); Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay 试剂盒 (Invitrogen 公司, P7589); Agilent High Sensitivity DNA 试剂盒 (美国 Agilent Technologies 公司, 5067-4626); 甲酸和乙腈等均为色谱纯; 水为 Millipore 超纯水。

供试药物的制备与成分分析 取地黄叶 500 g, 加入 80% 乙醇回流 2 h, 提取 3 次, 合并提取液, 减压浓缩, 浓缩至生药浓度 $1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 加入 0.5% 羧甲基纤维素钠超声溶解配制成 $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 药液, 即为地黄叶总苷提取物 (total glycoside extracted from leaves of *Rehmannia*, TLR), 待用。地黄叶总苷胶囊 (dihuangye total glycoside capsule, DTG) 为四川美大康药业股份有限公司提供的地黄叶总苷胶囊内容物, 加入 0.5% 羧甲基纤维素钠超声溶解配制成 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 药液。分别取 TLR 及 DTG 药液, $13000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液 $2 \mu\text{L}$ 进样。

UPLC-TQ-MS 条件 色谱柱为 Acquity UPLC BEH C_{18} ($100 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$, $1.7 \mu\text{m}$), 流动相为 0.1% 甲酸水 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱: $0 \sim 3 \text{ min}$, 97% A; $3 \sim 9 \text{ min}$, 97% ~ 5% A。体积流量: $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温: $35 \text{ }^\circ\text{C}$, 进样量: $2 \mu\text{L}$ 。离子化模式: ESI⁺; 检测方式为多反应检测 (MRM 方式); 毛细管电压: 3.0 kV ; 离子源温度: $150 \text{ }^\circ\text{C}$; 脱溶剂气温度: $550 \text{ }^\circ\text{C}$; 脱溶剂气体积流量: $1000 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$; 锥孔气体积流量: $50 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$; 碰撞气流量: $0.15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。测定的毛蕊花糖苷及梓醇的主要质谱参数见表 1。

Table 1 Mass spectrometry parameters of each component

Component	t_{R}/min	MRM	Cone voltage/V	Capillary energy/V
Catalpol	0.84	407.22 > 199.07	24	12
Acteoside	5.18	623.41 > 161.05	44	24

糖尿病肾病模型的建立及考察 随机选择 6 只 SD 大鼠, 作为正常组 (C 组), 以普通饲料喂养; 另取 42 只 SD 大鼠为造模组, 以高糖高脂饲料+5% 葡萄糖水喂养。喂养 21 天后, 记录各组大鼠体质量, 同时造模组腹腔注射 STZ 3 天, C 组腹腔注射枸橼酸缓冲液, STZ 给药方法: 大鼠实验前禁食 12 h, STZ 临用前以 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液 (pH 4.5) 配制成浓度为 1% 溶液, 按 $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔内注射^[7]。注射 STZ 72 h 后, 取正常组与造模组大鼠 24 h 尿液, 测定 24 h UP; 采用眼眶后采血, 测定 Scr 及 BUN; 采集血样测定空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG), 评估造模情况。

动物分组、给药及样品的采集 将造模成功的大鼠根据血糖水平随机分为 7 组: 模型组 (M)、黄葵胶囊组 ($0.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, HK)、厄贝沙坦组 ($27 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, YX)、地黄叶总苷胶囊低剂量组 ($216 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, JNL)、地黄叶总苷胶囊高剂量组 ($360 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,

JNH)、地黄叶总苷提取物低剂量组 ($4.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, DHYL) 和地黄叶总苷提取物高剂量组 ($7.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, DHYH)。正常组与模型组灌胃等量的生理盐水。给药组连续灌胃 2 周药物后, 收集新鲜粪便于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下保存分析测定。取 24 h 尿液, 测定 24 h UP; 采用腹主动脉采血, 测定 Scr 及 BUN; 采集血样测定 FBG。

粪便基因组 DNA 的提取与检测 称取 200 mg 粪便样品, 采用 PowerSoil[®] DNA 提取试剂盒提取粪便 DNA, 并用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳判断分子大小, 运用紫外分光光度法对 DNA 进行定量, 取适量的 DNA 样品于离心管中, 使用无菌水稀释样品至 $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

16S rDNA-V4 区 PCR 扩增 以上述稀释后的基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增。PCR 反应的条件为: $98 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; $98 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 0.5 min; $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 0.5 min; 0.5 min 延伸 $72 \text{ }^\circ\text{C}$; 共 27 个循环; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 扩展延伸 5 min; $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。PCR 产物使用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳检测; 根据 PCR 产物进行等浓度混样, 充分混匀后使用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 切取目的片段并用 Axygen 凝胶回收试剂盒回收目的片段。PCR 产物进行定量混合后, 使用 TruSeq Nano DNA LT Library Prep 试剂盒进行测序文库构建并使用 MiSeq Reagent Kit V4 (600 cycles) 进行 $2 \times 300 \text{ bp}$ 的双端测序。前引物序列: ACTCCTACGGGAGGCA GCA; 后引物序列: GGACTACHVGGGTWTCTAAT。

16S rDNA 文库构建与高通量测序 本实验利用 Illumina 公司的 TruSeq Nano DNA LT Library Prep 试剂盒进行建库。采用 Illumina MiSeq 平台对样本 DNA 片段进行双端 (paired-end) 测序。利用 FLASH 软件 (v1.2.7, <http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>), 对通过质量初筛的双端序列根据重叠碱基进行配对连接。最后, 根据每个样本所对应的 Index 信息 (即 Barcode 序列, 为序列起始处用于识别样本的一小段碱基序列), 将连接后的序列识别分配入对应样本 (要求 Index 序列完全匹配), 从而获得每个样本的有效序列。

结果

1 供试药物成分分析

采用外标法按上述色谱条件检测, 得出地黄叶总苷提取物及地黄叶总苷胶囊中毛蕊花糖苷质量分数分别为 6.833 和 $136.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; 且地黄叶总苷提取物中还含有梓醇 $6.326 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。此外, 地黄叶总苷提取物给药溶液和地黄叶总苷胶囊给药溶液相应剂量

中毛蕊花糖苷的含量保持一致。色谱图见图 1。

2 糖尿病肾病大鼠模型的评价

FBG 水平在 $16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上的大鼠被认为是糖尿病大鼠, 见表 2。此外, 与正常组相比, 造模组 24 h UP 的数量、BUN 及 Scr 显著增加 (均 $P < 0.01$)。结果显示, 早期糖尿病肾病模型复制成功, 并且存在肾小球滤过功能的损伤。给药 15 天后, 测定 FBG, 并收集 24 h 尿液, 测定 24 h UP 量; 腹主动脉取血, 测定 Scr 及 BUN。结果显示, 给药组能显著降低肾小球滤过功能的损伤, 尤其是地黄叶总苷胶囊。见图 2。

3 序列长度分布

粪便样品高质量序列比例均可达 60% 以上, 各

组粪便样品间无显著性差异, 见表 3。长度分布在 300~500 bp 内, 长度为 450 bp 的序列最多, 从序列长度的分布来看, 与 16S rDNA-V4 区序列长度大致吻合, 可用于后续分析。

Table 2 The establishment and investigation of diabetic nephropathy rats. FBG: Fasting blood glucose; Scr: Serum creatinine; BUN: Serum urea nitrogen; UP: Urine protein. $n=6$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs control group

Group	FBG / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	Scr / $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$	BUN / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h UP/mg
Control	5.02 ± 0.52	14.42 ± 7.19	3.48 ± 0.69	10.33 ± 1.27
Model	$21.08 \pm 1.76^{**}$	$59.46 \pm 18.51^{**}$	$12.01 \pm 0.80^{**}$	$20.08 \pm 5.85^{**}$

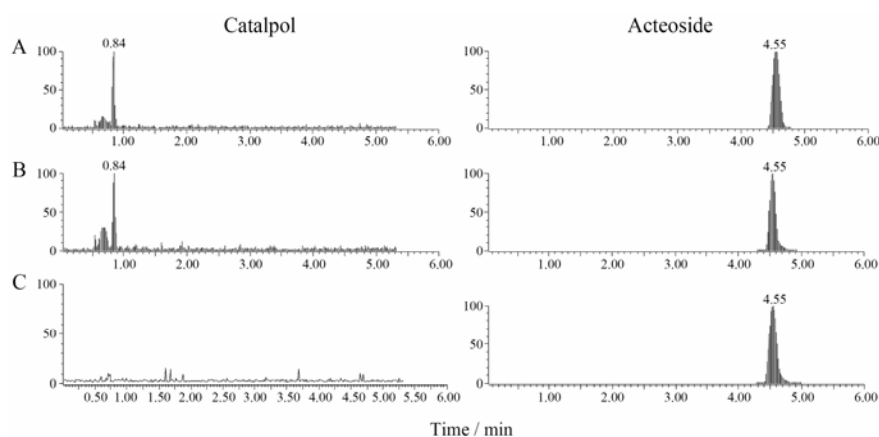


Figure 1 MRM chromatogram of reference substances (A), the total glycoside extracted from leaves of *Rehmannia* (TLR) (B), Dihuangye total glycoside capsule (DTG) (C)

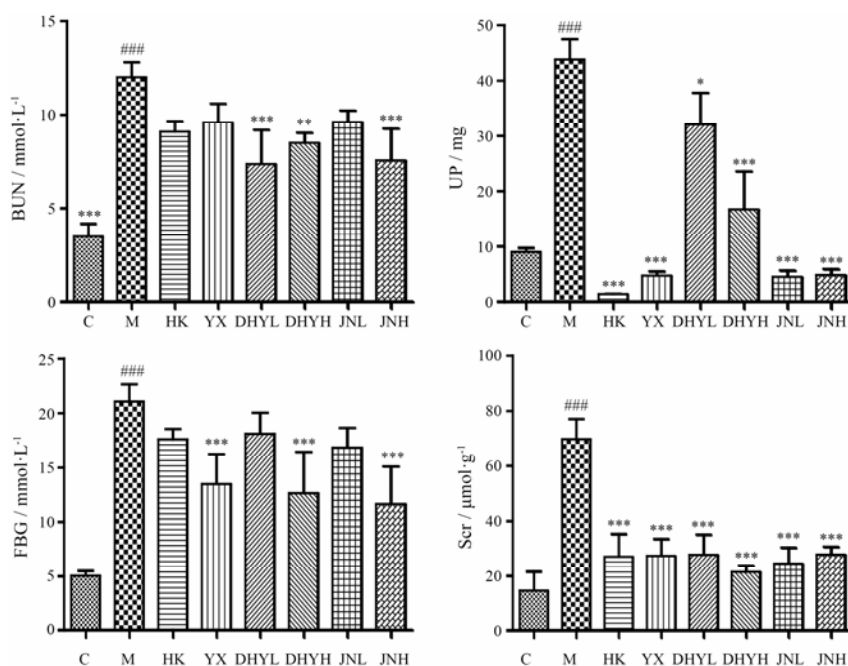


Figure 2 Determination of FBG, Scr, BUN and UP among control group, model group and administered group. C: Control group; M: Model group; HK: Huangkui capsule group; YX: Irbesartan group; DHYL: TLR low dose group; DHYH: TLR high dose group; JNL: DTG low dose group; JNH: DTG high dose group. $n=6$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs C group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs M group

Table 3 High quality sequences of samples. $n=6$, $\bar{x} \pm s$

Group	Effective sequence	High quality sequence	Proportion/%
C	35 820 ± 921	23 269 ± 1 170	61.62
M	31 991 ± 1 089	21 919 ± 695	65.47
HK	35 359 ± 1 982	24 329 ± 1 782	68.76
YX	36 126 ± 614	24 374 ± 685	64.34
DHYL	42 503 ± 1 505	28 574 ± 479	72.93
DHYH	39 581 ± 221	31 334 ± 1 049	82.87
JNL	38 603 ± 1 265	30 842 ± 1 240	76.01
JNH	39 542 ± 185	28 476 ± 624	72.65
Total	712 271	553 042	77.64

4 OTU 划分和分类地位鉴定

根据序列的相似性 (本分析中阈值设定为 97%), 将有效序列归为多个操作分类单元 (operational taxonomic units, OTU), 并将 OTU 中全部序列与相关数据库 GreenGenes (http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/JD_Tutorial/nph-16S.cgi) 进行比对, 找出与之最相近且可信度达 80% 以上的细菌种属信息, 采用 QIIME 软件分析测序结果。利用 Mothur 计算在 97% 的相似水平上每个样品的 OTU 数量, 可代表样品物种的丰度。在所有样品在门分类水平中, OTU 数量最多可达到 1 434, 最少为 1 002。且样品均不存在未分类 OTU。见表 4。

5 多样性分析

为比较不同样本的多样性, 首先对 OTU 丰度矩阵中的全部样本根据最低测序深度统一进行随机重抽样, 即“序列量拉平处理”, 从而校正测序深度引起的多样性差异。随后, 使用 QIIME 软件分别对每个样本计算多样性指数。Alpha 多样性 (alpha diversity) 反映的是单个样品内部的物种多样性, 通过群落丰度指数与群落多样性指数来衡量, 群落丰度指数包括 Chao1 和 ACE, 此指数数值越大说明群落的丰富度越高; 群落多样性指数包括 Shannon 与 Simpson, 此指数数值越大, 说明样品的物种多样性越高。结果表明, 由 Chao1 和 ACE 指数可看出, 正常组、黄葵胶囊组、

厄贝沙坦组、地黄叶总苷低剂量组、地黄叶总苷胶囊低剂量组、地黄叶总苷胶囊高剂量组与模型组相比均有统计学意义 ($P < 0.05$)。且与正常组相比, 模型组的群落丰富度显著降低; Shannon 与 Simpson 指数不具有统计学意义 ($P > 0.05$)。由此可见, 糖尿病肾病可降低大鼠肠道菌群丰富度, 但对物种多样性无显著性差异。由图 3 稀疏曲线可看出, 当前测序深度足以反映当前样本所包含的多样性, 继续增加测序深度已无法检测到大量的尚未发现的新 OTU。

6 菌群的群落结构

对各组中每个样本在分类学水平上的数量进行统计, 并且用柱状图表示在门和属分类学水平上的物种比例。在门的水平上整体的群落结构差异并不大 (图 4A)。各组中主要的门水平类有 Actinobacteria (放线菌门)、Bacteroidetes (拟杆菌门)、Cyanobacteria (蓝细菌)、Deferribacteres (脱铁杆菌门)、Firmicutes (厚壁菌门)、Proteobacteria (变形菌门)、TM7、Tenericutes (软皮菌类) 和 Verrucomicrobia (疣微菌门), 其中占比例最多的是厚壁菌门, 其次是拟杆菌门与变形菌门, 革兰阳性菌厚壁菌门与革兰阴性菌拟杆菌门在群落结构上占有绝对优势。在属分类水平上, 如图 4B 所示, 在正常组、模型组与各给药组中相对丰度较高的为乳酸杆菌属。

7 差异菌属筛选及药物调节作用

通过 Galaxy 在线分析平台 (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>), 提交属水平的相对丰度矩阵进行 LEfSe 分析。LEfSe 能自动对各分类水平的组成进行统计分析, 并能够在组与组之间寻找有统计学差异的物种^[8]。经 LEfSe 分析 (图 5), 与正常组相比, 糖尿病肾病模型组大鼠肠道菌群中门、纲、目、科和属分类水平上均发现差异菌群。在科及属分类的菌群中, 双歧杆菌属、传代菌属、消化链球菌科、脱硫弧菌属和 SMB53 在模型组呈现上调趋势, 乳酸杆菌属、梭菌属、理研菌科和瘤胃菌科在模型组呈现下

Table 4 Operational taxonomic units (OTU) classification and classification status identification results. $n=6$, $\bar{x} \pm s$

Group	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species
C	1 364 ± 73	1 364 ± 73	1 364 ± 73	1 157 ± 69	499 ± 88	37 ± 3
M	1 002 ± 185	1 002 ± 185	1 002 ± 185	887 ± 140	443 ± 73	47 ± 8
HK	1 275 ± 128	1 275 ± 128	1 274 ± 128	1 099 ± 96	587 ± 13	65 ± 1
YX	1 434 ± 28	1 434 ± 28	1 434 ± 28	1 269 ± 14	694 ± 27	55 ± 4
DHYL	1 251 ± 294	1 251 ± 294	1 250 ± 294	1 069 ± 309	555 ± 80	57 ± 6
DHYH	1 043 ± 306	1 043 ± 306	1 042 ± 305	915 ± 288	524 ± 115	59 ± 15
JNL	1 409 ± 347	1 409 ± 347	1 408 ± 348	1 234 ± 290	591 ± 111	63 ± 9
JNH	1 273 ± 322	1 273 ± 322	1 273 ± 322	1 163 ± 272	553 ± 86	55 ± 17

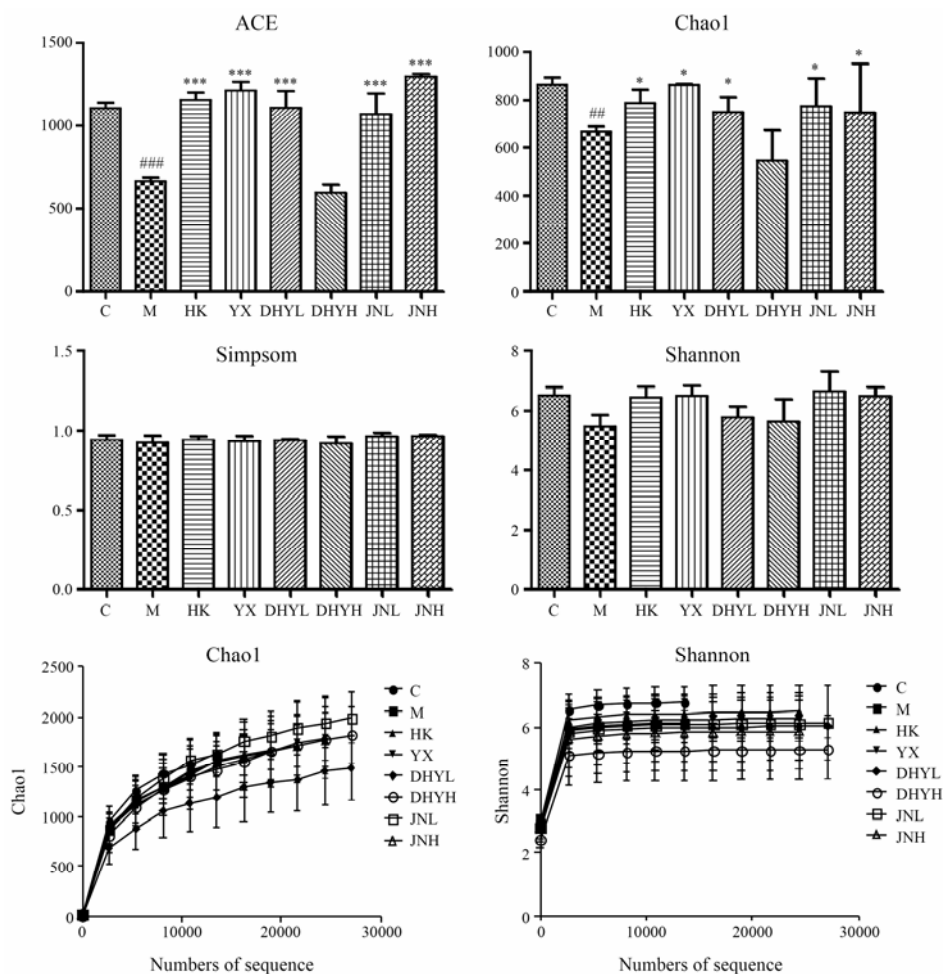


Figure 3 Rarefaction curve and diversity index of each group. $n=6$, $\bar{x} \pm s$. ### $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs C group; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs M group

调趋势。各组药物能不同程度地改善以上肠道菌群在模型组中的相对丰度 (图 6)。

讨论

目前制备糖尿病肾脏病大鼠模型的研究比较深入。主要采用高糖高脂饮食加 STZ 诱导注射或反复诱导的方法。经高糖高脂饮食后可诱导出现胰岛素抵抗, 注射 STZ 后, 胰岛细胞破坏及功能受损严重, 获得的模型接近于 2 型糖尿病肾病临床症状。本实验在此糖尿病肾病模型方法的基础进行改良, 采用高糖高脂饲料+5%葡萄糖饮水+小剂量多次注射 STZ 的方法^[7], 结果显示, 高糖引起渗透性利尿, 加速肾脏损伤; 血胰岛素明显升高; 且此方法成模时间相对短, 成模率高, 可用于对糖尿病肾病机制及相关治疗的研究。

本文建立了糖尿病肾病大鼠模型, 并通过 16S rDNA 测序的方法评价地黄叶总苷提取物和地黄叶总苷胶囊对糖尿病肾病大鼠肠道菌群的调节作用,

以从肠道微环境的角度揭示地黄叶总苷改善糖尿病肾病的作用机制。

研究发现, 与正常组相比, 糖尿病肾病模型组大鼠肠道内菌群从门水平到属水平均发生了变化。Larsen 等^[9]研究表明, 糖尿病大鼠肠道菌中厚壁菌门/拟杆菌门的比值降低, 且此比值和糖耐量成正相关性。由图 3A 所示, 在门分类水平上, 模型组大鼠肠道菌中厚壁菌门丰度下降, 拟杆菌门丰度上升, 主要原因可能是厚壁菌门中多数细菌是产丁酸盐菌^[10], 据文献^[11, 12]报道丁酸盐是一种抗炎的短链脂肪酸盐, 可为肠黏膜提供营养, 增强肠黏膜免疫。由此说明, 糖尿病肾病造成一定程度的大鼠肠道菌群失调。

值得注意的是, 双歧杆菌为肠道内有益菌群, 而本研究结果显示, 与正常组相比, 模型组双歧杆菌属比例显著增加, 原因可能是高糖状态下, 机体自身发生应激反应, 逆转机体慢性炎症反应状态^[13]。在微生物类群中, 乳酸杆菌是一群生活在机体内有益于宿主健康的微生物, 其调节免疫功能的作用已被广泛认

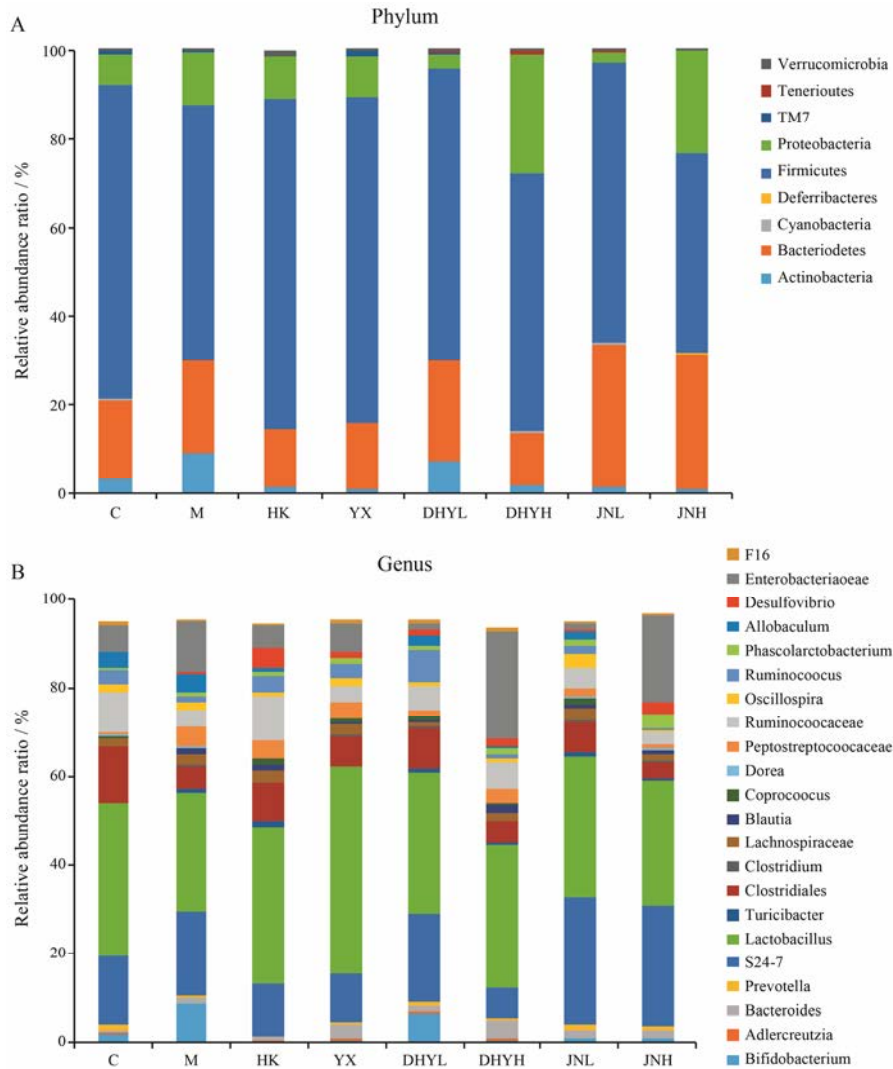


Figure 4 The differences in the community composition between the phylum (A) and the genus (B) units. The width of different patches indicates the relative abundance ratio of different species

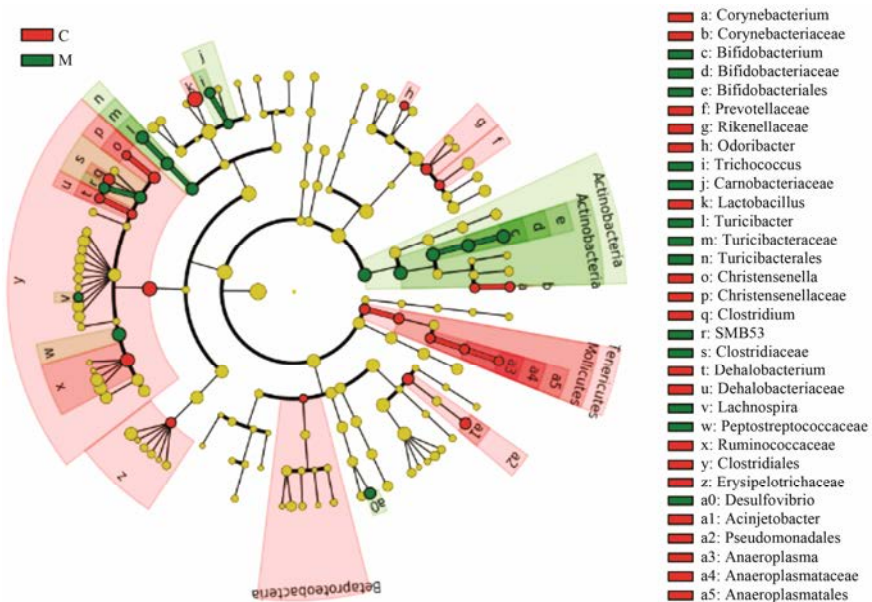


Figure 5 Classification of group classification based on classification tree

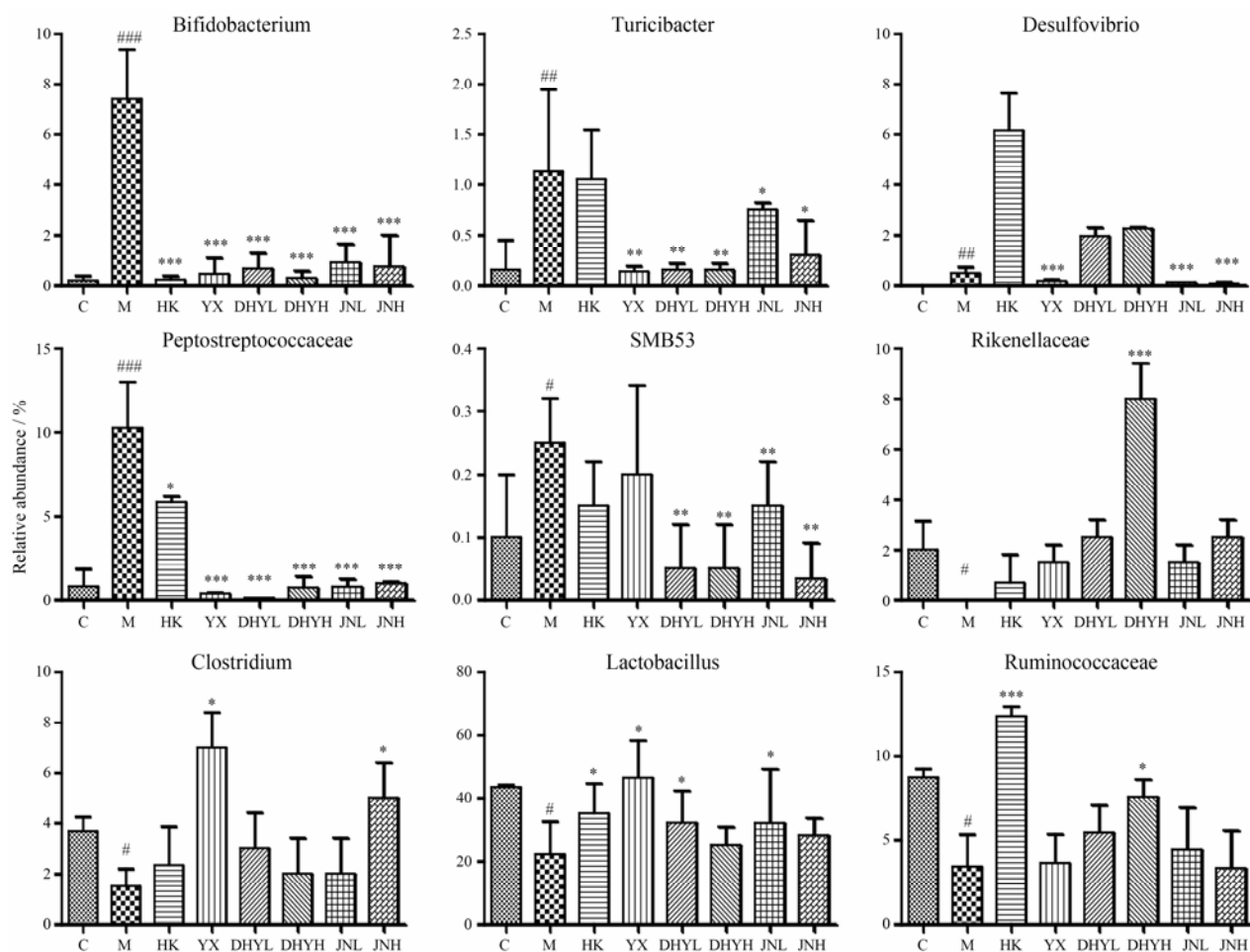


Figure 6 Average relative abundance of difference features flora in feces of all treatment groups. $n=6$, $\bar{x} \pm s$. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs C group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs M group

可^[14]。此外，乳酸杆菌的比例较高，可增加胰岛素分泌^[15]。因此，增加乳酸杆菌比例被认为对2型糖尿病患者具有降低感染和血糖的保护作用，提示肠道菌群的变化是糖尿病肾病改善的主要原因之一^[16]。与正常组相比，糖尿病肾病模型组大鼠肠道菌中乳酸杆菌属比例显著降低。这可能是由于尿液或尿酸在体液中积累，导致大部分富含氮的废弃物通过体内肠道来进行释放，使得利用其作为营养物质的微生物群落处于优势地位，导致大鼠肠道微生物菌群失调^[17,18]。给药组中乳酸杆菌属比例有所回升，尤其是厄贝沙坦组、地黄叶总苷提取物低剂量组和地黄叶总苷胶囊低剂量组，结果表明地黄叶总苷可改善STZ诱导的糖尿病肾病大鼠肠道菌群的失调。

References

[1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 124–125.

[2] Shen X, Li DF, Zong GZ, et al. Effects of total saponins extracted from leaves of *Rehmannia* on accelerated nephrotoxic nephritis induced by rabbit IgG in rat [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2010, 16: 167–169.

[3] Kuang YW. Study on the Dynamic Accumulation of Catalpol in Fresh Leaves of *Rehmannia glutinosa* and Its Anti-psoriasis Effect (鲜地黄叶中梓醇的积累动态及其抗银屑病作用的研究) [D]. Shanghai: Academy of Military Medical Sciences, 2009.

[4] Lv M, Chen Z, Hu G, et al. Therapeutic strategies of diabetic nephropathy: recent progress and future perspectives [J]. Drug Discov Today, 2015, 20: 332–346.

[5] Tilg H, Moschen AR. Microbiota and diabetes: an evolving relationship [J]. Gut, 2014, 63: 1513–1521.

[6] Mclean MH, Jr DD, Miller LM, et al. Does the microbiota play a role in the pathogenesis of autoimmune diseases? [J]. Gut, 2015, 64: 332–341.

[7] Lin Q. The Establishment of Rat Model of Type 2 Diabetic Nephropathy and the Inhibitory Effect of Lentiviral Vector-

- mediated siRNA on Type I Collagen (2 型糖尿病肾病大鼠模型的建立及慢病毒载体介导 siRNA 对 I 型胶原抑制作用的研究) [D]. Shanghai: Second Military Medical University, 2011.
- [8] Scher JU, Szczesnak A, Longman RS, et al. Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis [J]. *Elife*, 2013, 2: e01202.
- [9] Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults [J]. *PLoS One*, 2010, 5: e9085.
- [10] Qin J, Li Y, Cai Z, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes [J]. *Nature*, 2012, 490: 55–60.
- [11] Hamer HM, Jonkers D, Venema K, et al. Review article: the role of butyrate on colonic function [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2008, 27: 104–119.
- [12] Louis P, Flint HJ. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine [J]. *Fems Microbiol Lett*, 2009, 294: 1–8.
- [13] Wang ML, Xu AG. Analysis of intestinal microflora in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *J Guangdong Med (广东医学)*, 2013, 34: 2006–2010.
- [14] Cao ZH, Liu YS, Pan HB, et al. Advances in research on probiotics function and mechanism of lactic acid bacteria [J]. *Food Sci Technol (食品工业科技)*, 2015, 36: 366–370, 377.
- [15] Simon MC, Strassburger K, Nowotny B, et al. Intake of *Lactobacillus reuteri* improves incretin and insulin secretion in glucose-tolerant humans: a proof of concept [J]. *Diabetes Care*, 2015, 38: 1827–1834.
- [16] Lin Z, Zu XP, Xie HS, et al. Research progress in mechanism of intestinal microorganisms in human diseases [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 843–852.
- [17] Guo HL, Shao YY, Menghe B, et al. Research on the relation between gastrointestinal microbiota and disease [J]. *Microbiol China (微生物学通报)*, 2015, 42: 400–410.
- [18] Vaziri ND, Wong J, Pahl M, et al. Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora [J]. *Kidney Int*, 2012, 83: 308–315.