

## 四妙方通过增加肠道 *Akkermansia muciniphila* 改善胰岛素抵抗的作用机制研究

严娟, 盛丽莉, 李艳, 包义扬, 李后开\*

(上海中医药大学中药学院, 上海 201203)

**摘要:** 四妙方能够改善高糖高脂饮食诱导的糖代谢紊乱, 并调控肠道菌群组成, 特别是增加肠道 *Akkermansia muciniphila* (*A. muciniphila*) 的丰度。但是, 肠道菌群和 *A. muciniphila* 在四妙方改善糖代谢中的确切作用, 以及四妙方上调 *A. muciniphila* 的机制尚不清楚。本研究将通过体内外实验探讨四妙方改善胰岛素抵抗与 *A. muciniphila* 的相关性及四妙方升高 *A. muciniphila* 的作用机制。利用肠道菌群移植及抗生素干扰等方法, 研究肠道菌群组成和 *A. muciniphila* 丰度变化对四妙方改善高糖高脂诱导的小鼠胰岛素抵抗的作用; 通过四妙方拆方动物实验和药效评价, 明确升高 *A. muciniphila* 的关键药味和组分; 利用体外厌氧培养系统结合细胞动物实验, 探索四妙方关键组分增加 *A. muciniphila* 含量的作用机制。动物福利和实验过程均遵循上海中医药大学动物伦理委员会的规定。结果显示, 四妙方改变的肠道菌群可在受体小鼠中发挥改善高糖高脂饮食诱导的胰岛素抵抗的作用, 且改善效果与 *A. muciniphila* 丰度呈正相关; 君药黄柏是四妙方中调控肠道菌群组成并增加 *A. muciniphila* 的关键药物, 而黄柏中主要活性成分小檗碱与黄柏在上调 *A. muciniphila* 丰度上作用相近。体外机制研究发现, 小檗碱不能直接促进 *A. muciniphila* 的生长, 但能通过激活肠细胞黏蛋白的表达, 间接促进 *A. muciniphila* 的增殖。上述结果表明, 四妙方改善胰岛素抵抗的作用很可能依赖于增加肠道 *A. muciniphila* 数量, 且四妙方升高 *A. muciniphila* 的作用很可能与君药黄柏中小檗碱激活肠细胞黏蛋白的表达有关。

**关键词:** 四妙方; 胰岛素抵抗; *Akkermansia muciniphila*; 小檗碱; 黏蛋白

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)12-3502-11

## Mechanism study of Si Miao Formula on alleviating insulin resistance by increasing the abundance of *Akkermansia muciniphila* in mice

YAN Juan, SHENG Li-li, LI Yan, BAO Yi-yang, LI Hou-kai\*

(School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

**Abstract:** In our previous study, we found that Si Miao Formula (SMF) had the effect of improving the disorder of glucose metabolism caused by high fat and high sucrose diet, and significantly altered the composition of gut microbiota, especially increasing the level of *Akkermansia muciniphila* (*A. muciniphila*). However, it is unclear that the role of intestinal flora and *A. muciniphila* play in SMF improving blood glucose homeostasis, and the mechanism of how SMF increases the level of *A. muciniphila*. Therefore, this study will explore the correlation between SMF improving the insulin resistance and increasing the level of *A. muciniphila*, as well as the mechanism of SMF-induced growth of *A. muciniphila* using the *in vitro* and *in vivo* experiments. We explored the effect of intestinal flora and *A. muciniphila* on SMF-improved insulin resistance through fecal microbiota transplantation (FMT) and antibiotic

收稿日期: 2022-03-28; 修回日期: 2022-04-17.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81873059, U21A20413); 转化医学国家重大科技基础设施 (上海) 开放课题 (TMSK-2021-403); 上海市卫生健康委员会中医药科研项目 (2020JP016); 上海市优秀学术带头人项目 (21XD1403500).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-21-51322729, E-mail: houkai1976@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0357

intervention. In order to study the mechanisms underlying SMF on elevating *A. muciniphila*, we disassembled SMF to find the key component which can particularly elevate the number of *A. muciniphila*. Using the *in vitro* anaerobic culture system combined with cell and animal experiments, we explored the mechanism of the key component in elevating *A. muciniphila*. The research was approved by the Animal Ethical and Welfare Committee of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine. Our results showed that the gut microbiota altered by SMF can improve high fat and sucrose diet induced insulin resistance in recipient mice, and the improvement was closely related to the abundance of *A. muciniphila*. *Cortex Phellodendri* played the most important role in regulating the composition of intestinal flora and increasing the number of *A. muciniphila*, of which, berberine was the key component of *Cortex Phellodendri* which up regulated *A. muciniphila*. We have found that berberine cannot directly promote the growth of *A. muciniphila in vitro*, but it can stimulate the expression of mucin, which, in turn, promote the growth of *A. muciniphila*. The above results show that the improved insulin sensitivity by SMF depends on the increased level of *A. muciniphila*. The effect of SMF on elevating the amount of *A. muciniphila* might be correlated with the increased expression of mucin stimulated by berberine.

**Key words:** Si Miao Formula; insulin resistance; *Akkermansia muciniphila*; berberine; mucin

四妙方出自清代张秉承的《成方便读》，由黄柏、苍术、薏苡仁、牛膝四味中药组成，是治疗风湿痹症、痛风的经典方剂。痛风的中医证候分为：湿热蕴结、瘀热阻滞、痰浊阻滞及肝肾阴虚四型，湿热蕴结是痛风最常见的证型<sup>[1]</sup>。非酒精性脂肪肝（NAFLD）在中医中属于“肝癖”的范畴，湿热蕴结也是其常见证型之一<sup>[2]</sup>。以上中医学理论表明，湿热蕴结证在痛风和NAFLD中都是比较常见的中医证型。同时现代药理学研究显示四妙方具有良好的降尿酸效果<sup>[3]</sup>，而尿酸累积可诱导胰岛素抵抗和炎症反应<sup>[4-6]</sup>，增加肝脏脂质蓄积，高尿酸血症是NAFLD的独立危险因素之一<sup>[7]</sup>，因此降尿酸可能成为NAFLD潜在的治疗靶标。本课题组前期基于中医“异病同治”的治则，以降尿酸为靶点，研究四妙方改善NAFLD的效果。药效学结果表明，四妙方可降低高糖高脂饮食喂养小鼠的血清尿酸水平及肝脏脂质变性，并改善小鼠胰岛素抵抗<sup>[8]</sup>。肠道菌群测序结果发现，四妙方能调控肠道菌群的组成，特别是增加肠道“益生菌”*Akkermansia muciniphila* (*A. muciniphila*)的丰度，而本课题组前期研究发现*A. muciniphila*具有调节血糖作用<sup>[9]</sup>。然而，肠道菌群，特别是*A. muciniphila*，在四妙方改善胰岛素抵抗中的作用并不清楚。

肠道微生物群数量和多样性的变化是许多代谢性疾病发生发展的重要因素<sup>[10]</sup>。临床研究表明，与健康人相比，2型糖尿病患者肠道菌群组成紊乱，*A. muciniphila*丰度显著降低，拟杆菌及丁酸产生菌的含量显著下降<sup>[11]</sup>。同时有研究发现，将健康人的肠道菌群移植给胰岛素抵抗患者可显著改善患者的胰岛素敏感性<sup>[12]</sup>。因此，靶向肠道菌群调节已成为临床上改善2型糖尿病极具潜力的治疗手段。

*A. muciniphila*作为一种新生代的“益生菌”，在改

善糖脂代谢方面具有重要的作用<sup>[13,14]</sup>。临床和动物研究发现，*A. muciniphila*与肥胖和2型糖尿病呈负相关<sup>[15-17]</sup>，并且给予*A. muciniphila*干预可明显改善由高脂饮食引起的小鼠代谢紊乱、胰岛素抵抗、炎症激活和脂肪沉积等<sup>[13,14,18]</sup>。*A. muciniphila*作为一种黏液降解细菌，可通过降解黏蛋白产生短链脂肪酸（乙酸和丙酸）<sup>[19,20]</sup>，并与丁酸产生菌相互作用，促进丁酸产生<sup>[21]</sup>，从而激活肠道内胃肠激素分泌，调节宿主能量平衡，改善葡萄糖稳态等<sup>[22-26]</sup>；同时，黏液又可作为细菌生长的能量来源，促进*A. muciniphila*生长<sup>[19]</sup>。近年来有研究发现*A. muciniphila*活菌、巴氏灭活的*A. muciniphila*或*A. muciniphila*的不同组分（Amuc\_1100、P9、AmEVs等）可通过激活Toll样受体调控肠道稳态、改善肠道通透性减少脂多糖渗漏减轻机体炎症、激活胰高血糖素样肽-1分泌改善机体代谢等途径改善高脂饮食诱导的胰岛素抵抗<sup>[26-29]</sup>。同时，*A. muciniphila*改善2型糖尿病的临床研究也已被批准<sup>[30]</sup>。上述研究表明，*A. muciniphila*在改善糖脂代谢方面具有十分重要的作用。

本课题组前期研究证实了四妙方对肥胖小鼠的胰岛素抵抗具有改善作用，且其能恢复肥胖小鼠的肠道菌群失衡、增加*A. muciniphila*丰度等<sup>[8]</sup>。但四妙方改善胰岛素抵抗的作用与其增加肠道*A. muciniphila*丰度的关系，以及四妙方升高*A. muciniphila*的物质基础与机制并不清楚。因此，本研究将通过肠道菌群移植及抗生素干扰方法，研究四妙方改变的肠道菌群组成及增加的*A. muciniphila*在改善胰岛素敏感性方面的作用；通过四妙方拆方实验探究其升高*A. muciniphila*的物质基础；通过细菌体外厌氧培养及细胞、动物实验研究四妙方关键组分升高*A. muciniphila*的作用机制，

揭示四妙方通过调控肠道菌组成,进而改善胰岛素抵抗的作用机制。

## 材料与方法

**实验动物** 雄性 C57BL/6J 小鼠, SPF 级, 4 周龄, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 许可证号: SCXK (沪) 2017-0005, 动物合格证号: 20170005059267。小鼠饲养于上海中医药大学实验动物中心, 上海中医药大学伦理委员会已批准本研究中的所有实验, 动物福利和实验过程均遵循上海中医药大学动物伦理委员会的规定。

**菌株和细胞** *A. muciniphila* (BAA 835) 购自 ATCC 库; LS174T 人结肠腺癌细胞购自中国科学院细胞库。

**药品与试剂** 高脂饲料 (货号 D12492, Research Diets 公司); 蔗糖 (货号 G66841B)、氨苄西林钠盐 (货号 77396C) (上海泰坦科技股份有限公司); 黄柏、苍术、薏苡仁、牛膝 (上海康桥中药饮片有限公司); 注射用盐酸万古霉素 [货号 VL0657, VIANEXS. A. (PLANTC) 公司]; 甲硝唑 (货号 M1547)、二甲基亚砜 (DMSO, 货号 D2650)、黏液蛋白 Type III (货号 M1778) (Sigma 公司); 壮观霉素二盐酸盐五水合物溶液 [货号 B541016-0001, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司]; 硫酸链霉素 (货号 XW38107401)、葡萄糖 (货号 63005518)、 $\text{NaHCO}_3$  (货号 10018960) (国药集团化学试剂有限公司); 生物合成人胰岛素注射液 (丹麦诺和诺德公司); 血糖测试仪 (Performa, 罗氏 ACCU-CHEK 公司); 粪便基因组 DNA 提取试剂盒 (货号 DP328-02)、FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂 (货号 KR118)、动物组织总 RNA 提取试剂盒 (货号 DP431) [天根生化科技 (北京) 有限公司]; 小鼠胰岛素 (INS) 试剂盒 (ELISA) (货号 ml001983, 上海酶联生物科技有限公司); 盐酸小檗碱 (货号 B802465, Macklin 公司); DMEM 培养基 (货号 12800017)、双抗 (货号 1989513) (GIBCO 公司); 胎牛血清 (货号 1805172, Biological Industries 公司); 磷酸盐缓冲液 (PBS, Solarbio 公司); 胰酶-EDTA (货号 MA0233, 大连美仑生物技术有限公司); RNAiso Plus (货号 9109, Takara 公司); 脑心浸液培养基 (货号 BD 237500, 美国 BD 公司); 阿利新蓝-过碘酸-雪夫 (AB-PAS) 染色 (货号 GP1041, 武汉塞维尔生物科技有限公司)。

**仪器** 二氧化碳培养箱 (型号 CCL-170B-8, Esco 公司); 真空过滤系统 (货号 BS-500-XT, Biosharp 公司); 超微量分光光度计 (型号 Colibri, 德国 Berthold Technologies 公司); 实时定量 PCR 仪 (型号 CFX Connect, 美国 Bio-Rad 公司); 高通量组织研磨仪 (型

号 SKSI, 上海必横生物有限公司); 多功能酶标仪 (Spark10M, 瑞士帝肯公司); 恒温厌氧箱 (BACTRON EZ-2, 美国 Shellab 公司)。

**四妙方药液的提取浓缩** 称取黄柏 200 g、苍术 100 g、薏苡仁 200 g、牛膝 100 g, 共计药物 600 g 混匀, 加入 4.8 L 水, 4 °C 浸泡过夜。煮沸后, 计时 1.5 h, 获得第 1 遍药液。后加 3.6 L 水煎煮第 2 遍后, 将两次所得滤液混匀, 浓缩至药液浓度为  $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (生药量)。

**四妙方药效学实验** 将 18 只 C57BL/6J 小鼠随机分成 3 组, 分别为正常对照组 (control, Con)、高糖高脂组 (high fat high sucrose, HFHS) 和四妙方组 (high fat high sucrose-Si Miao Formula, SMF)。正常对照组小鼠喂食普通饲料 16 周; 高糖高脂组小鼠使用高脂饲料联合饮用 30% 的蔗糖水喂养 16 周; 四妙方组小鼠喂食高糖高脂饮食同时进行四妙方给药 16 周 (小鼠每天的给药剂量按照生药量计算为  $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。每周记录小鼠体重及摄食量, 在 15 和 16 周分别进行葡萄糖耐量实验 (intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT) 和胰岛素耐量实验 (insulin tolerance test, ITT)。

**肠道细菌 16S rRNA 测序** 小鼠干预 16 周后, 取各组小鼠新鲜的盲肠内容物进行肠道细菌 16S rRNA 测序, 测序工作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, 采取属分类进行肠道菌群的分类学组成分析<sup>[31]</sup>。

**粪菌移植实验** 将上述四妙方药效学实验中的高糖高脂组和四妙方组小鼠作为供体, 从给药第 2 周起收集各组小鼠粪便进行粪菌移植实验。受体小鼠参照文献<sup>[32]</sup>中的方法, 饮用水中添加终浓度为  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的氨苄西林, 联合混合抗生素溶液 (万古霉素:新霉素:甲硝唑 = 1:2:2) 每 12 h 灌胃 1 次, 连续干预 7 天建立伪无菌小鼠模型。将 9 只伪无菌小鼠随机分成 2 组, 分别为高糖高脂受体组 (R-HFHS) 和四妙方受体组 (R-SMF), 分别接受来自 HFHS 组和 SMF 组小鼠的粪便。所有受体小鼠每周记录 1 次体重、摄食量及饮水量, 在 16 和 17 周分别进行 IPGTT 和 ITT。

**四妙方联合不同抗生素干预实验** 将 48 只 C57BL/6J 小鼠随机分成 2 组, 分别为高糖高脂对照组和四妙方干预组。两组小鼠分别被分成 4 个亚组, 为高糖高脂组 (DW)、壮观霉素组 (SPE)、万古霉素组 (VAN)、链霉素组 (SM), 对照组每亚组 5 只小鼠, 四妙方干预组每亚组 7 只小鼠, 均使用高脂饲料联合饮用 30% 的蔗糖水进行饲养, 所用抗生素均溶解在 30% 的蔗糖水中, 浓度为  $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。对照组灌胃生理盐水, 四妙方干预组灌胃四妙方, 各组抗生素干预持续至实

验结束, 分别在 19 和 20 周进行 IPGTT 和 ITT。

**四妙方拆方实验** 分别除去四妙方中的君、臣、佐、使药组成不同的药味组合, 根据各药味在全方中的占比 [黄柏 (黄): 苍术 (苍): 薏苡仁 (薏): 牛膝 (牛) = 2:1:2:1], 设置给药剂量, 四妙方全方组给药剂量为  $10 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 黄薏牛组 (HYN) 给药剂量为  $8.33 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; 黄苍牛组 (HCN) 给药剂量为  $6.67 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; 黄苍薏组 (HCY) 给药剂量为  $8.33 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; 苍薏牛组 (CYN) 给药剂量为  $6.67 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; 黄柏组 (HB) 给药剂量为  $3.33 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。各拆方组药液提取方法与上述四妙方全方提取浓缩步骤相同。将 55 只 C57BL/6J 小鼠随机分成 8 组, 正常对照组 (Con,  $n = 5$ ), 高糖高脂组 (HFHS,  $n = 8$ ), 四妙方及其拆方组每组 7 只小鼠。正常对照组小鼠喂食正常饮食, 其余组别均使用高糖高脂进行饲养, 干预周期为 16 周。

**IPGTT** 将蔗糖水换成普通水, 小鼠禁食不禁水 14 h 后进行 IPGTT。实验开始前, 小鼠尾尖取血测定空腹血糖 (FPG) 值。腹腔注射 10% 葡萄糖溶液 ( $1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 尾尖取血分别测定注射后 0、15、30、60、90、120 min 时血糖值, 绘制 IPGTT 曲线并计算曲线下面积 (AUC)。

**ITT** 将蔗糖水换成普通水, 小鼠禁食不禁水 4 h, 进行 ITT。腹腔注射胰岛素 ( $0.75 \text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 尾尖取血分别测定 0、15、30、60、90、120 min 时血糖值, 绘制 ITT 曲线并计算 AUC。

**空腹胰岛素 (FINS) 测定及胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR) 计算** 取小鼠血清, 根据小鼠 INS 试剂盒操作说明进行检测。HOMA-IR 计算方法如下:  $\text{FPG} (\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}) \times \text{FINS} (\mu\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}) / 22.5$ 。

**粪便 *A. muciniphila* 含量测定** 按照粪便基因组 DNA 提取试剂盒操作说明提取小鼠粪便基因组 DNA, 以 *A. muciniphila* 的相对保守基因为检测的靶基因, 参考文献中的引物设计<sup>[33]</sup>, 建立实时荧光定量 PCR 反应体系, 检测不同粪便样本中 *A. muciniphila* 保守基因的拷贝数, 计算粪便细菌全基因组 DNA 中 *A. muciniphila* 的含量。

**小檗碱体外干预 *A. muciniphila* 实验** 配制盐酸小檗碱药液体外干预 *A. muciniphila*, 药物终浓度为: 1、10、100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。培养条件为: 37 °C 恒温厌氧 ( $\text{N}_2:\text{CO}_2:\text{H}_2 = 95:5:5$ ), 培养至 0、12、24、36、48、72 h 取样, 将待测样本充分振荡混匀后, 12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 2 min, 上清液作为空白对照, 使用酶标仪分别测定待测样本及其上清在 600 nm 处的吸光度 (*A*), 取每个药物浓度 3 个重复实验的平均值进行计算, 以时间为横坐标,  $\Delta A_{600}$  为纵坐标绘制生长曲线。

**黏蛋白体外干预 *A. muciniphila* 实验** 配制含有黏蛋白的脑心浸液培养基, 含量为 0.25%, 以单独的脑心浸液培养基作为对照, 将处于对数生长期的 *A. muciniphila* 液按照 1:10 的比例加入到两种培养基中, 培养至 0、6、12、24、36、48 h 取样, 测定菌液在 600 nm 处的 *A* 值, 以时间为横坐标,  $\Delta A_{600}$  为纵坐标绘制生长曲线。

**小檗碱干预 LS174T 细胞实验** 将细胞铺到 12 孔板中 (每孔  $2 \times 10^4$  个), 于 37 °C 培养 24 h; 使用 DMSO 配制浓度为 0、0.5、2、6  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的盐酸小檗碱储备液, 各浓度使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基稀释 1 000 倍, 制备含药培养基; 每孔加入 1 mL 的含药培养基, 于 37 °C 细胞培养箱继续培养 24 h, 每个浓度设 3 个复孔, 对照孔不含盐酸小檗碱, 空白孔中不含细胞和盐酸小檗碱。Trizol 法提取细胞 RNA, 按照逆转录试剂盒操作说明, 将 RNA 逆转成 cDNA, 并进行实时荧光定量 PCR 检测。

**小檗碱对动物肠道黏蛋白分泌影响实验** 将 10 只 C57BL/6J 小鼠随机分成 2 组, 分别为高糖高脂组 (HFHS) 和小檗碱组 (BBR), 均采用高糖高脂饮食进行饲养。HFHS 组小鼠灌胃纯水作为对照, BBR 组小鼠灌胃小檗碱溶液 ( $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 共干预 16 周。16 周后收集小鼠各组织样本, 结肠组织使用卡诺氏液 (无水乙醇: 氯仿: 乙酸 = 6:3:1) 固定<sup>[34]</sup>, 并进行 AB-PAS 染色, 通过 ImageJ 测量结肠黏液层厚度。按照试剂盒操作说明提取结肠 RNA, 逆转成 cDNA 后进行实时荧光定量 PCR, 检测结肠黏蛋白分泌及杯状细胞分化相关基因表达, 引物序列详见表 1。

**数据分析** 使用 GraphPad Prism 9.1.1 软件进行数据计算及曲线生成, 采用 Student's *t* test 或单因素方差分析 (one-way ANOVA) 对各组间差异显著性进行统计学分析, 以平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。

## 结果

### 1 四妙方改善高糖高脂饮食引起的小鼠胰岛素抵抗

首先通过四妙方干预 16 周对小鼠血糖稳态的影响研究发现, 四妙方干预显著改善高糖高脂饮食诱导的糖耐量异常 (IPGTT 结果, 图 1A), 并可明显改善小鼠的胰岛素敏感性 (ITT 结果, 图 1B), 同时, 四妙方干预后可显著降低高糖高脂喂养小鼠的 FPG、FINS 及 HOMA-IR (图 1C)。

### 2 四妙方显著改变肠道菌群组成并升高 *A. muciniphila* 含量

通过四妙方干预小鼠的肠道菌群组成分析发现, 3 组小鼠的肠道菌群结构存在较大差异 (图 2A)。在属

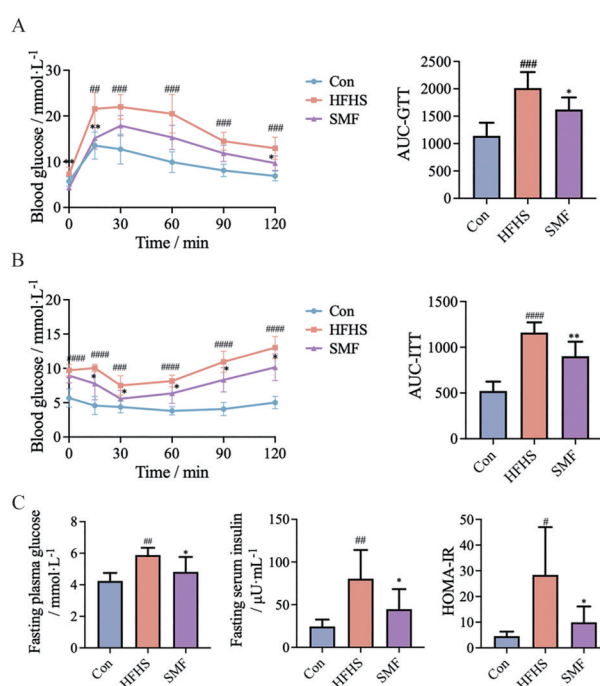
**Table 1** Polymerase chain reaction (PCR) primer sequence of each gene. *Muc2*: Mucin-2; *Muc3*: Mucin-3; *Muc4*: Mucin-4; *Gapdh*: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Hes*: Hes family BHLH transcription factor; *Klf4*: Kruppel like factor 4; *Relm-β*: Resistin-like molecule beta; *Tff3*: Trefoil factor 3; m: Mouse; h: Human; *A. muciniphila*: *Akkermansia muciniphila*; F: Forward; R: Reverse

Primer	Sequence (5'-3')
m- <i>Muc2</i> -F	AAGTGAAGACCGAGATTGTGC
m- <i>Muc2</i> -R	GTGCACACACACCCTTG
m- <i>Muc3</i> -F	TTCTATGGGCCACGGTGT
m- <i>Muc3</i> -R	ACTGTTACTGTCACACTCACTCC
m- <i>Muc4</i> -F	GAGGGCTACTGTCACAATGGAGGC
m- <i>Muc4</i> -R	AGGGTTCGGAAGAGGATCCCGTAG
m- <i>Gapdh</i> -F	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
m- <i>Gapdh</i> -R	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
m- <i>Hes</i> -F	CCAGCCAGTGTCAACACGA
m- <i>Hes</i> -R	AATGCCGGGAGCTATCTTTCT
m- <i>Klf4</i> -F	AGGAACTCTCTCACATGAAGCG
m- <i>Klf4</i> -R	GGTCGTTGAACTCCTCGGTC
m- <i>Relm-β</i> -F	CCATTTCCTGAGCTTTCTGG
m- <i>Relm-β</i> -R	AGCACATCCAGTGACAACCA
m- <i>Tff3</i> -F	CAGATTACGTTGGCCTGTCTCC
m- <i>Tff3</i> -R	ATGCTTGCTACCCTTGACCAC
h- <i>Gapdh</i> -F	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
h- <i>Gapdh</i> -R	TGGTGAAGACGCCAGTGGA
h- <i>Muc2</i> -F	ACCCGCACTAGTTCACCTTC
h- <i>Muc2</i> -R	GGGATCGCAGTGGTAGTTGT
<i>A. muciniphila</i> -F	CAGCACGTGAAGGTGGGGAC
<i>A. muciniphila</i> -R	CCTGCGGTTGGCTTCAGAT

水平上, 四妙方干预后, *Akkermansia* 的相对丰度从 0.02% 升至 25.16% (图 2B)。由于 16S rRNA 测序结果为相对丰度, 并不能反映样本中特定菌种的绝对含量, 因此本研究通过荧光定量 PCR 方法对小鼠肠道内的 *A. muciniphila* 进行了绝对定量分析。结果显示, 四妙方干预后, 小鼠粪便 *A. muciniphila* 的含量为 HFHS 组小鼠的 8.6 倍 (图 2C)。*A. muciniphila* 作为新型候选益生菌, 临床和动物研究发现, *A. muciniphila* 干预可显著调节血糖水平并改善机体炎症<sup>[14]</sup>。因此, 本研究推测四妙方改善胰岛素抵抗与肠道菌群结构的改变及 *A. muciniphila* 含量的增加相关。

### 3 四妙方改善胰岛素抵抗作用与调控肠道菌群组成密切相关

通过粪菌移植实验, 进一步研究了肠道菌群在四妙方改善胰岛素抵抗中的作用 (图 3A)。抗生素预处理 7 天后, 肠道菌群 16S rRNA 的拷贝数由每毫克粪便  $(2.7 \pm 1.3) \times 10^9$  copies 降低为  $(7.5 \pm 1.9) \times 10^4$  copies, 表明伪无菌小鼠模型建立成功。粪菌移植实验结果显示, 两组受体小鼠的能量摄入无统计学差异, 但与 R-HFHS 组小鼠相比, R-SMF 组小鼠体重增长减缓 (图 3B)。IPGTT 结果发现, 与 R-HFHS 组相比, R-SMF 组小鼠的葡萄糖耐受程度明显改善 (图 3C), 且 R-SMF

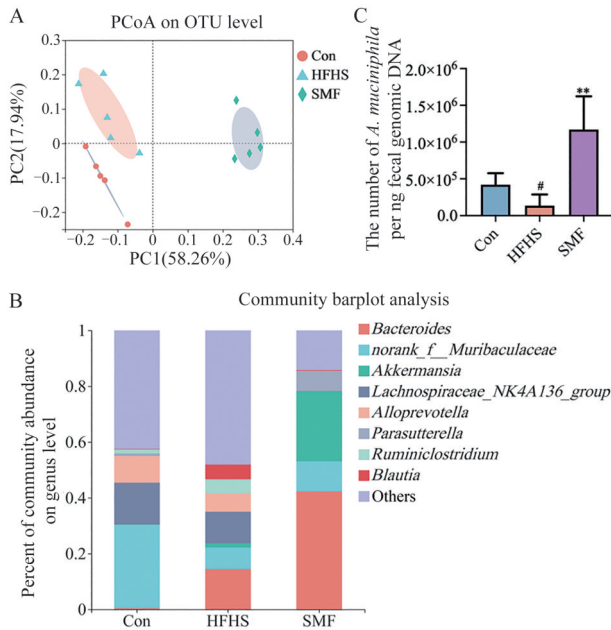


**Figure 1** Effects of Si Miao Formula (SMF) on improving the insulin sensitivity. A: Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) and area under the curve of GTT (AUC-GTT); B: Insulin tolerance test (ITT) and area under the curve of ITT (AUC-ITT); C: Fasting plasma glucose (FPG), fasting serum insulin (FINS), and homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR).  $n = 6, \bar{x} \pm s$ . # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ , #### $P < 0.0001$  vs Con; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs HFHS. Con: Mice in control group were supplied with chow diet for 16 weeks; HFHS: Mice in HFHS group were fed with high fat and high sucrose diet for 16 weeks; SMF: Mice in treatment group were fed with high fat and high sucrose diet supplemented with aqueous extracts of SMF for 16 weeks

组小鼠的空腹血糖值显著低于 R-HFHS 组 (图 3D), 表明四妙方干预改变的肠道菌群可改善由高糖高脂饮食诱导的糖耐量受损。ITT 结果显示, 与 R-HFHS 组相比, R-SMF 组小鼠的胰岛素敏感性显著增强 (图 3E)。以上结果均能反映四妙方干预改变的肠道菌群可改善高糖高脂饮食诱导的胰岛素抵抗。同时, 结果发现四妙方受体小鼠肠道 *A. muciniphila* 数量显著增加, 表明 *A. muciniphila* 也会随着菌群移植过程定植到受体小鼠肠道内 (图 3F), 提示四妙方改善胰岛素抵抗与肠道菌群结构变化及 *A. muciniphila* 含量增加密切相关。

### 4 四妙方改善胰岛素抵抗依赖于肠道 *A. muciniphila*

为了探究四妙方改善胰岛素抵抗是否与 *A. muciniphila* 相关, 本研究使用不同抗菌谱的抗生素改变小鼠肠道内 *A. muciniphila* 数量, 并在此基础上给予四妙方干预观察其是否仍具有改善胰岛素抵抗的作用 (图 4A)。对小鼠肠道 *A. muciniphila* 绝对定量分析



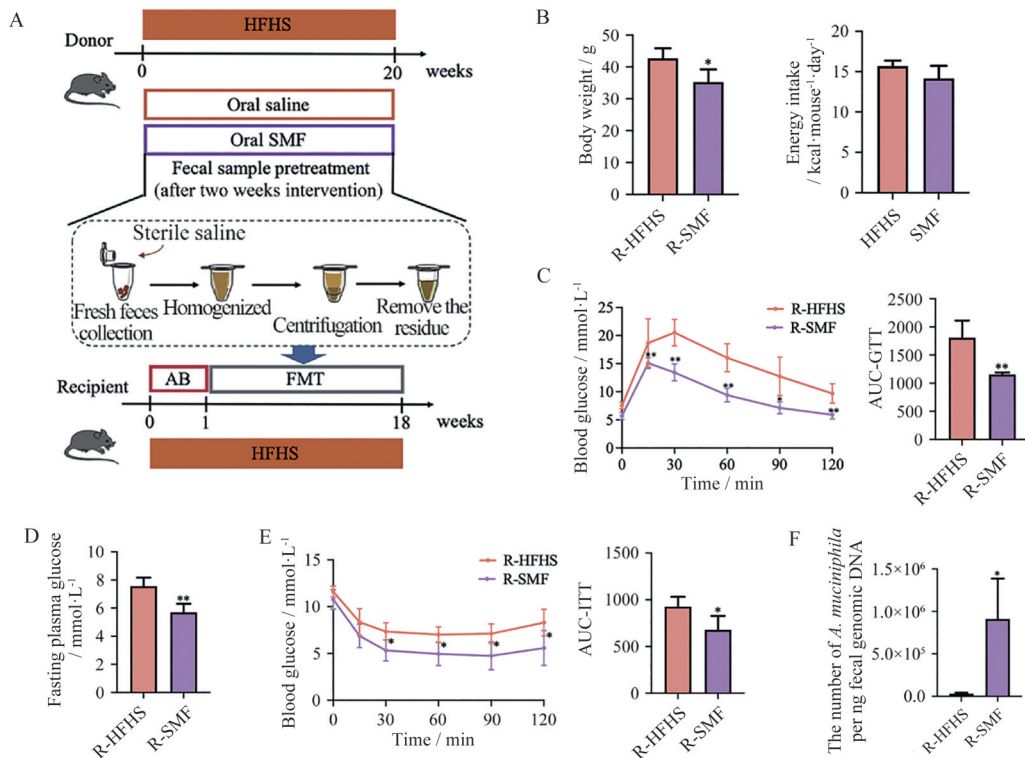
**Figure 2** SMF significantly changes the composition of gut microbes and increased the number of *A. muciniphila*. A: Principal co-ordinates analysis (PCoA) analysis based on weighted UniFrac similarity; OTU: Operational taxonomic units; PC: Principal component; B: Relative abundance of gut microbiota at the genus level; C: The number of *A. muciniphila* per ng fecal genomic DNA.  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . # $P < 0.05$  vs Con; \*\* $P < 0.01$  vs HFHS

发现,与DW组相比,壮观霉素与链霉素显著抑制小鼠肠道内的 *A. muciniphila* 的增长,万古霉素显著升高 *A. muciniphila* 的含量(图4B)。四妙方干预后,壮观霉素仍可显著降低小鼠粪便 *A. muciniphila* 含量 ( $P < 0.0001$ ),而链霉素抑制 *A. muciniphila* 生长的作用消失;万古霉素组与链霉素组小鼠粪便 *A. muciniphila* 数量与DW组相比无统计学差异(图4C)。

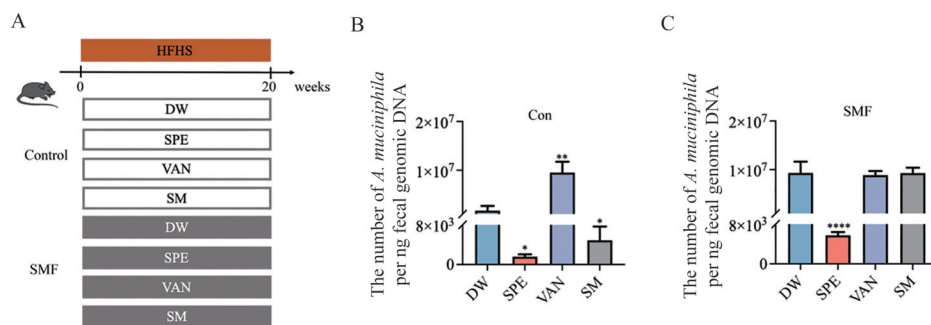
为了探究各组小鼠的胰岛素敏感性差异,本研究进行了IPGTT和ITT。IPGTT结果显示,除壮观霉素饮水组外,四妙方干预可显著改善高糖高脂喂养的其他组小鼠的葡萄糖耐受情况(图5A)。ITT结果显示,除壮观霉素组外,在其他条件下,四妙方均具有改善胰岛素抵抗的作用(图5B)。以上结果说明,壮观霉素干预消除了四妙方改善高糖高脂喂养小鼠胰岛素抵抗的作用, *A. muciniphila* 在四妙方改善高糖高脂喂养小鼠胰岛素敏感性中发挥重要作用。

### 5 黄柏中的小檗碱是四妙方升高 *A. muciniphila* 的关键组分

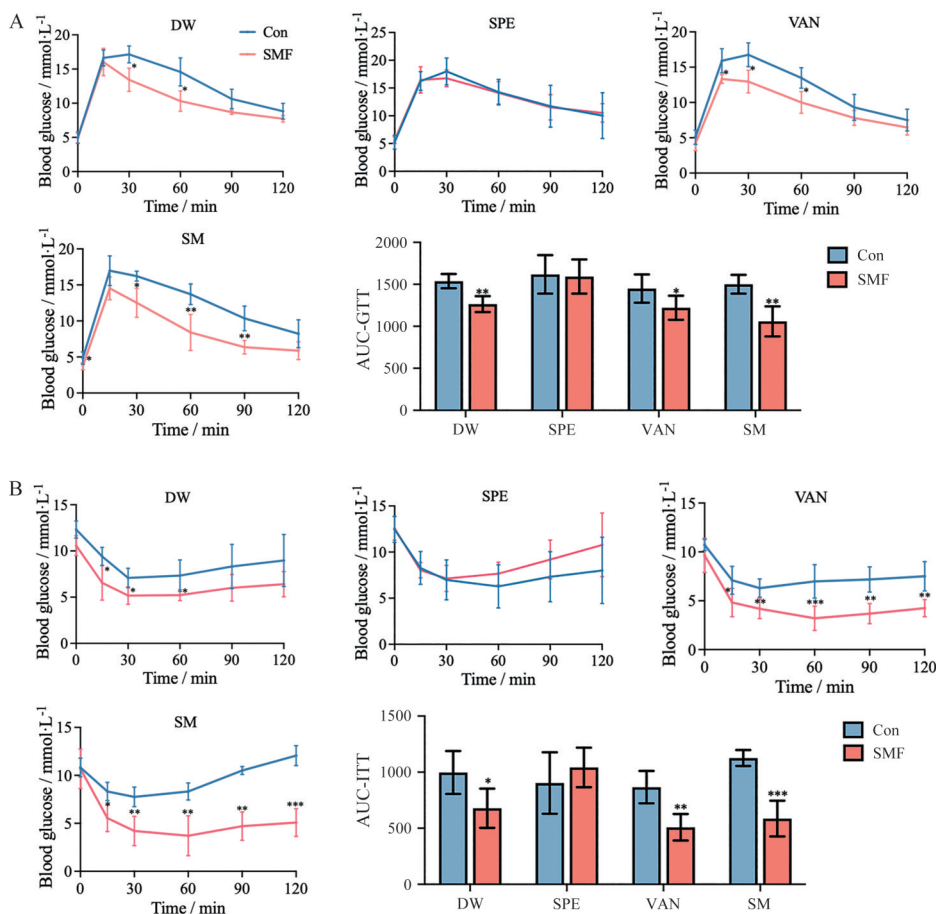
肠道 *A. muciniphila* 在四妙方改善胰岛素抵抗过程中起重要作用,但四妙方升高 *A. muciniphila* 的物质基础尚不清楚。因此本研究对四妙方进行拆方,分别除去四妙方中的君、臣、佐、使药,组成不同的药味组合



**Figure 3** Fecal microbiota from SMF-fed mice improves insulin sensitivity. A: Experimental diagram; B: Body weight and energy intake; C: IPGTT; D: Fasting plasma glucose; E: ITT; F: The number of *A. muciniphila* per ng fecal genomic DNA.  $n = 4-5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs R-HFHS. R-HFHS: Mice in R-HFHS group were supplied with the fecal microbiota from high fat and high sucrose diet-fed mice for 18 weeks; R-SMF: Mice in R-SMF group were supplied with the fecal microbiota from SMF treated mice for 18 weeks



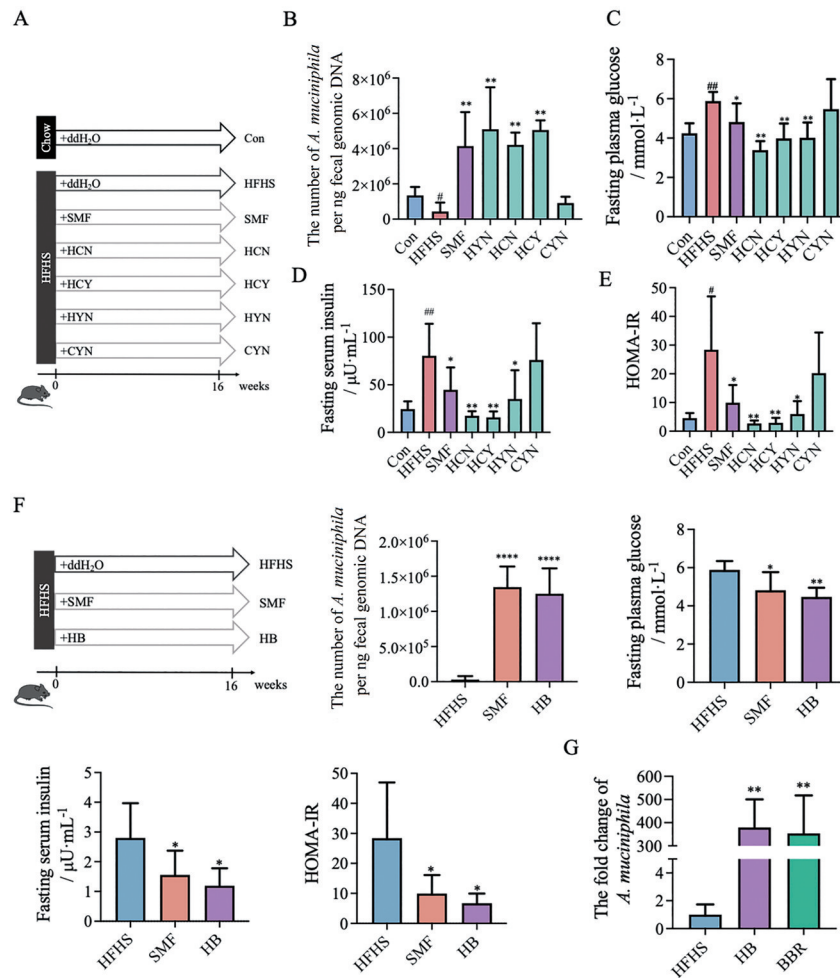
**Figure 4** Effect of different antibiotic on the number of *A. muciniphila* in mice. A: Experimental diagram; B: The number of *A. muciniphila* per ng fecal genomic DNA in control group mice; C: The number of *A. muciniphila* per ng fecal genomic DNA in SMF group mice.  $n = 5-7$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  vs DW. Con: Mice in control group were supplied with high fat and high sucrose diet for 20 weeks; SMF: Mice in SMF group were fed with high fat and high sucrose diet supplemented with aqueous extracts of SMF for 20 weeks. DW: Mice in DW group were provided with 30% ( $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) sucrose solution; SPE: Mice in SPE group were provided with 30% sucrose solution which contained  $50 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  spectinomycin; VAN: Mice in VAN group were provided with 30% sucrose solution which contained  $50 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  vancomycin; SM: Mice in SM group were provided with 30% sucrose solution which contained  $50 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  streptomycin



**Figure 5** Effect of SMF on improving glucose tolerance and insulin tolerance in the high fat and high sucrose fed mice with different antibiotics. A: IPGTT; B: ITT.  $n = 5-7$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs Con

进行动物实验,分析四妙方不同药味组合对小鼠肠道内 *A. muciniphila* 含量的影响(图6A)。结果发现,与高糖高脂饮食喂养小鼠相比,含有君药黄柏的药味组合显著升高小鼠粪便中 *A. muciniphila* 含量 ( $P < 0.01$ ),而

由苍术、薏苡仁和牛膝三味中药组成的复方对小鼠肠道 *A. muciniphila* 的含量无显著影响(图6B)。同时,发现含有黄柏的药味组合均能显著降低高糖高脂喂养小鼠的 FPG、FINS 和 HOMA-IR,但苍术、薏苡仁和牛膝



**Figure 6** Effects of combinations of different herbs from SMF on improving the insulin sensitivity in mice. A: Experimental diagram; B: The number of *A. muciniphila* per ng fecal genomic DNA; C: Fasting plasma glucose; D: Serum insulin; E: HOMA-IR; F: Effects of *Cortex Phellodendri* on improving the insulin sensitivity; G: The fold change of *A. muciniphila* in mice.  $n = 5-8$ ,  $\bar{x} \pm s$ . #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs Con; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.0001$  vs HFHS. Con: Mice were supplied with chow diet for 16 weeks; HFHS: Mice were fed with high fat and high sucrose diet; SMF: Mice were fed with high fat and high sucrose diet and aqueous extracts of SMF; HCN: Mice were fed with high fat and high sucrose diet and aqueous extracts of SMF without *Coicis Semen*; HCY: Mice were fed with high fat and high sucrose diet and aqueous extracts of SMF without *Cyathulae Radix*; HYN: Mice were fed with high fat and high sucrose diet and aqueous extracts of SMF without *Atractylodis Rhizoma*; CYN: Mice were fed with high fat and high sucrose diet and aqueous extracts of SMF without *Cortex Phellodendri* for 16 weeks; HB: Mice were fed with high fat and high sucrose diet and aqueous extracts of *Cortex Phellodendri* for 16 weeks; BBR: Mice were fed with high fat and high sucrose diet and berberine for 16 weeks

药味组合无此作用(图6C~E)。

为进一步明确黄柏是否是四妙方升高 *A. muciniphila* 改善胰岛素抵抗的关键中药, 本研究将黄柏单独给予高糖高脂喂养小鼠(图6F)。结果发现, 与高糖高脂喂养小鼠相比, 单独黄柏干预也可显著升高 *A. muciniphila* 的含量 ( $P < 0.0001$ ), 且与四妙方干预组无统计学差异。同时黄柏干预后, 可显著降低高糖高脂喂养小鼠的FPG、FINS和HOMA-IR, 与四妙方改善胰岛素抵抗作用一致。上述结果表明, 四妙方升高 *A. muciniphila* 含量改善胰岛素抵抗依赖君药黄柏。

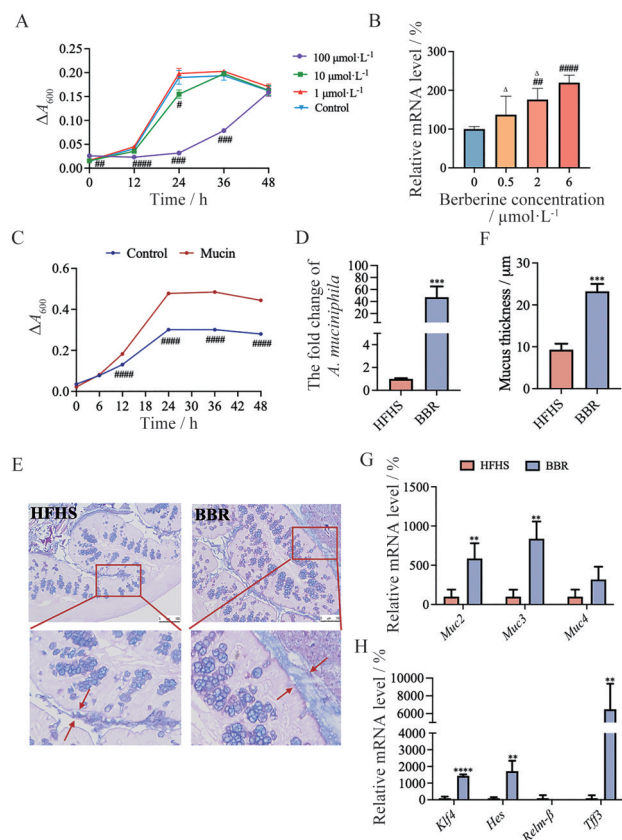
为了进一步探究黄柏升高 *A. muciniphila* 的关键化学成分, 结合本团队前期四妙方汤剂化学成分的含量测定结果, 本研究发现四妙方汤剂色谱图中的主要成分峰来自于黄柏水提物, 且小檗碱的含量最多<sup>[35]</sup>。因此为了验证黄柏升高 *A. muciniphila* 的关键物质成分是否为小檗碱, 通过高效液相色谱测定黄柏水煎液 ( $0.33 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 中小檗碱的含量 ( $2.74 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 并依此计算出黄柏水煎液与小檗碱的等效剂量, 开展动物实验。结果发现, 黄柏水煎液与等效剂量小檗碱干预两周后均显著升高小鼠肠道中 *A. muciniphila* 数

量,且两组间无统计学差异(图6G),提示黄柏升高*A. muciniphila*的作用可能主要依赖于小檗碱。

### 6 小檗碱升高*A. muciniphila*的作用机制

为了探究小檗碱升高*A. muciniphila*的作用机制,本研究通过体外小檗碱干预*A. muciniphila*实验,研究小檗碱对*A. muciniphila*生长的作用。结果显示,浓度为1 μmol·L<sup>-1</sup>的盐酸小檗碱对*A. muciniphila*生长无明显影响,而高浓度小檗碱对*A. muciniphila*生长的抑制作用明显,并呈现剂量依赖性关系(图7A),提示小檗碱并没有直接促进*A. muciniphila*生长的作用,其可能是通过改变*A. muciniphila*生长的肠道环境发挥间接促进作用。

*A. muciniphila*是一种肠道黏液降解细菌,可利用



**Figure 7** Mechanism of berberine in elevating *A. muciniphila*. A: Effect of berberine on the growth of *A. muciniphila* *in vitro*; B: Effect of berberine on *Muc2* gene expression in LS174T cells; C: Effect of mucin on the growth of *A. muciniphila* *in vitro*; D: The fold change of *A. muciniphila* level after berberine supplementation in mice; E: Periodic acid Schiff and Alcian blue stained colon tissue. Scale bar: 100 μm, opposing red arrows with shafts delineate the mucus layer; F: Blinded colonic mucus layer measurements from Alcian blue-stained sections; G: mRNA levels of *Muc2*, *Muc3*, *Muc4* in colon; H: mRNA levels of *Klf4*, *Hes*, *Relm-β*, *Tff3* in colon. *n* = 5,  $\bar{x} \pm s$ . #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01, ###*P* < 0.001, ####*P* < 0.0001 vs Con; Δ*P* < 0.05 vs 6 μmol·L<sup>-1</sup> berberine group; \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001, \*\*\*\**P* < 0.0001 vs HFHS

肠道中的黏蛋白作为自身生长的能量来源。因此本研究通过体外细胞实验探究小檗碱是否具有刺激肠道杯状细胞分泌黏蛋白的功能。使用不同浓度的盐酸小檗碱干预LS174T细胞(一种研究杯状细胞功能的体外细胞模型),结果发现,小檗碱可剂量依赖性地促进LS174T细胞黏蛋白编码基因*Muc2*的表达(图7B)。同时,黏蛋白体外干预*A. muciniphila*实验也表明,黏蛋白对*A. muciniphila*的生长具有明显的促进作用(图7C)。

为了明确小檗碱在动物水平也具有相同的作用,本研究使用小檗碱干预高糖高脂喂养小鼠,发现小檗碱可显著升高小鼠肠道内*A. muciniphila*的含量(*P* < 0.001,图7D),增加结肠黏液层的厚度(图7E、F),显著升高黏蛋白分泌及杯状细胞分化的基因表达(图7G、H)。以上实验结果表明,小檗碱通过增加小鼠肠道内的黏蛋白分泌,提供更多的能量来源促进*A. muciniphila*的生长。

### 讨论

本研究基于传统中医药理论,探索肠道菌群在四妙方改善胰岛素抵抗方面的重要作用,并结合现代分子生物学技术研究四妙方改变特定肠道菌的潜在机制,初步探讨四妙方改善胰岛素抵抗的具体作用机制。研究结果表明肠道菌群尤其是*A. muciniphila*在四妙方改善胰岛素抵抗方面发挥重要作用,且四妙方升高*A. muciniphila*的作用可能与黄柏中的小檗碱刺激结肠黏蛋白的表达有关。

肠道是人体消化和吸收的重要场所,在代谢健康方面发挥着重要作用<sup>[36]</sup>。肠道菌群紊乱是引起肥胖等代谢性疾病的重要因素<sup>[37,38]</sup>。大量研究发现,天然药物尤其是中草药,可通过重塑肠道菌群改善机体代谢<sup>[39-41]</sup>,且具有温和但显著的降血糖效果<sup>[42-44]</sup>。肠道菌群数据分析结果显示,四妙方干预可改善由高糖高脂饮食引起的肠道菌群紊乱,显著升高*A. muciniphila*丰度<sup>[8]</sup>。*A. muciniphila*作为目前治疗代谢性疾病最具潜力的肠道“益生菌”<sup>[45,46]</sup>,大部分降糖药物改善胰岛素抵抗与肠道中*A. muciniphila*丰度增加密切相关<sup>[47]</sup>。因此本研究推测肠道菌群的结构变化在四妙方改善胰岛素抵抗方面发挥重要作用,通过粪菌移植实验及四妙方联合不同抗生素干预实验证实了肠道菌群以及*A. muciniphila*在四妙方改善胰岛素抵抗方面的重要作用。但是,在万古霉素干预条件下,四妙方并没有进一步增加小鼠肠道*A. muciniphila*的丰度,却仍具有改善胰岛素敏感性的作用,提示四妙方改善胰岛素抵抗可能并不完全依赖于*A. muciniphila*。四妙方作为一种中

药复方,化学成分复杂,其整体药理作用很可能存在多靶点效应。

黄柏中的小檗碱是四妙方升高小鼠肠道 *A. muciniphila* 数量并改善高糖高脂诱导的胰岛素抵抗的关键物质。但黄柏中除了小檗碱外,还包括其他化学成分,这些成分对肠道 *A. muciniphila* 的影响尚未见报道,还需进一步探索。本研究发现,小檗碱可通过刺激肠道杯状细胞分化及黏蛋白分泌促进 *A. muciniphila* 增殖。Dong 等<sup>[48]</sup>的研究结果与本研究结果相似,都发现小檗碱干预后小鼠肠道 *A. muciniphila* 含量增加,结肠黏蛋白产生基因的转录和黏蛋白的分泌增多。但是,小檗碱在体内引起结肠黏液层增厚,可能有两方面原因:①小檗碱直接刺激杯状细胞分泌黏蛋白;②小檗碱干预改变肠道菌群的组成使 *A. muciniphila* 含量增加进而促使黏蛋白分泌增加。Dong 等<sup>[48]</sup>的研究并没有明确小檗碱促进黏液分泌具体是哪种途径。本研究通过体外细胞实验,发现小檗碱在无 *A. muciniphila* 时,也可直接促进黏蛋白分泌增加,证实了小檗碱可通过直接刺激杯状细胞分泌黏蛋白促进 *A. muciniphila* 的生长。但小檗碱作为一种生物碱,具有一定的抑菌作用<sup>[44]</sup>,并能显著改变肠道菌群的组成<sup>[49,50]</sup>。因此,小檗碱是否会影响肠道内其他微生物的含量进而对 *A. muciniphila* 生长产生影响还有待进一步探索。

**作者贡献:** 严娟负责所有的动物实验,以及样本采集、指标检测与论文撰写;盛丽莉负责实验方案设计、实验研究与论文写作指导;李艳与包义扬协助数据分析与动物实验;李后开指导整个项目和论文修改。

**利益冲突:** 全体作者声明不存在任何利益冲突。

## References

- [1] Yan HF, Yang KL, Fan KT, et al. Discussion of traditional Chinese medicine regularity for gout [J]. *Tianjin J Tradit Chin Med* (天津中医药), 2016, 33: 629-633.
- [2] Zhan XX, Kang YN, Zhou TT, et al. General research on the correlation between TCM syndromes and objective indexes of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Clin J Chin Med* (中医临床研究), 2019, 11: 142-145.
- [3] An SH. 36 Cases of acute gouty arthritis treated by Si Miao Formula [J]. *Shandong J Tradit Chin Med* (山东中医杂志), 2010, 29: 436.
- [4] Zhang YM. Correlation analysis between serum inflammatory factor levels and HOMA-IR index in 200 patients with hyperuricemia [J]. *Med J Liaoning* (辽宁医学杂志), 2022, 36: 79-81.
- [5] Niu Q, Liu LX, Guo XH. The association of uric acid with insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease: a Meta-analysis [J]. *Chin J Gastroenterol Hepatol* (胃肠病学和肝病杂志), 2021, 30: 1393-1402.
- [6] Niu Y, Tang Q, Zhao X, et al. Obesity-induced insulin resistance is mediated by high uric acid in obese children and adolescents [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12: 773820.
- [7] Li LW. Prevalence and risk factor analysis of nonalcoholic fatty liver disease in examination patients with type 2 diabetes [J]. *Med Diet Health* (医学食疗与健康), 2022, 20: 117-120.
- [8] Han R, Qiu H, Zhong J, et al. Si Miao Formula attenuates non-alcoholic fatty liver disease by modulating hepatic lipid metabolism and gut microbiota [J]. *Phytomedicine*, 2021, 85: 153544.
- [9] Sheng L, Jena PK, Liu HX, et al. Obesity treatment by epigallocatechin-3-gallate-regulated bile acid signaling and its enriched *Akkermansia muciniphila* [J]. *FASEB J*, 2018, 32: fj201800370R.
- [10] Xu WT, Nie YZ, Yang Z, et al. The crosstalk between gut microbiota and obesity and related metabolic disorders [J]. *Future Microbiol*, 2016, 11: 825-836.
- [11] Zhang X, Shen D, Fang Z, et al. Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e71108.
- [12] Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, et al. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome [J]. *Gastroenterology*, 2012, 143: 913-916.e7.
- [13] Plovier H, Everard A, Druart C, et al. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice [J]. *Nat Med*, 2017, 23: 107-113.
- [14] Everard A, Belzer C, Geurts L, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: 9066-9071.
- [15] Yassour M, Lim MY, Yun HS, et al. Sub-clinical detection of gut microbial biomarkers of obesity and type 2 diabetes [J]. *Genome Med*, 2016, 8: 17.
- [16] Medina-Vera I, Sanchez-Tapia M, Noriega-López L, et al. A dietary intervention with functional foods reduces metabolic endotoxaemia and attenuates biochemical abnormalities by modifying faecal microbiota in people with type 2 diabetes [J]. *Diabetes Metab*, 2019, 45: 122-131.
- [17] Everard A, Lazarevic V, Gaña N, et al. Microbiome of prebiotic-treated mice reveals novel targets involved in host response during obesity [J]. *ISME J*, 2014, 8: 2116-2130.
- [18] Yan J, Sheng L, Li H. *Akkermansia muciniphila*: is it the Holy Grail for ameliorating metabolic diseases? [J]. *Gut Microbes*, 2021, 13: 1984104.
- [19] Derrien M, Vaughan EE, Plugge CM, et al. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54: 1469-1476.
- [20] Ottman N, Davids M, Suarez-Diez M, et al. Genome-scale model and omics analysis of metabolic capacities of reveal a preferential

- mucin-degrading lifestyle [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2017, 83: e01014-17.
- [21] Belzer C, De Vos WM. Microbes inside – from diversity to function: the case of *Akkermansia* [J]. *ISME J*, 2012, 6: 1449-1458.
- [22] Macfarlane GT, Macfarlane S. Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health [J]. *J AOAC Int*, 2012, 95: 50-60.
- [23] Christiansen CB, Gabe MBN, Svendsen B, et al. The impact of short-chain fatty acids on GLP-1 and PYY secretion from the isolated perfused rat colon [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2018, 315: G53-G65.
- [24] Psichas A, Sleeth ML, Murphy KG, et al. The short chain fatty acid propionate stimulates GLP-1 and PYY secretion *via* free fatty acid receptor 2 in rodents [J]. *Int J Obes (Lond)*, 2015, 39: 424-429.
- [25] Zhou D, Chen YW, Zhao ZH, et al. Sodium butyrate reduces high-fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis through up-regulation of hepatic GLP-1R expression [J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50: 1-12.
- [26] Yoon HS, Cho CH, Yun MS, et al. *Akkermansia muciniphila* secretes a glucagon-like peptide-1-inducing protein that improves glucose homeostasis and ameliorates metabolic disease in mice [J]. *Nat Microbiol*, 2021, 6: 563-573.
- [27] Ottman N, Reunanen J, Meijerink M, et al. Pili-like proteins of *Akkermansia muciniphila* modulate host immune responses and gut barrier function [J]. *PLoS One*, 2017, 12: e0173004.
- [28] Ashrafiyan F, Shahriary A, Behrouzi A, et al. Derived extracellular vesicles as a mucosal delivery vector for amelioration of obesity in mice [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 2155.
- [29] Cani PD, Knauf C. A newly identified protein from *Akkermansia muciniphila* stimulates GLP-1 secretion [J]. *Cell Metab*, 2021, 33: 1073-1075.
- [30] Perraudeau F, McMurdie P, Bullard J, et al. Improvements to postprandial glucose control in subjects with type 2 diabetes: a multicenter, double blind, randomized placebo-controlled trial of a novel probiotic formulation [J]. *BMJ Open Diabetes Res Care*, 2020, 8: e001319.
- [31] Ma J, Hong Y, Zheng N, et al. Gut microbiota remodeling reverses aging-associated inflammation and dysregulation of systemic bile acid homeostasis in mice sex-specifically [J]. *Gut Microbes*, 2020, 11: 1450-1474.
- [32] Reikvam DH, Erofeev A, Sandvik A, et al. Depletion of murine intestinal microbiota: effects on gut mucosa and epithelial gene expression [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e17996.
- [33] Collado MC, Derrien M, Isolauri E, et al. Intestinal integrity and *Akkermansia muciniphila*, a mucin-degrading member of the intestinal microbiota present in infants, adults, and the elderly [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73: 7767-7770.
- [34] Desai MS, Seekatz AM, Koropatkin NM, et al. A dietary fiber-deprived gut microbiota degrades the colonic mucus barrier and enhances pathogen susceptibility [J]. *Cell*, 2016, 167: 1339-1353.e21.
- [35] Qiu HH, Han RT, Sheng LL, et al. Comparative study on prevention of Simiao Formula granules and decoction on non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Chin Tradit Herb Drug (中草药)*, 2021, 52: 1031-1038.
- [36] Fan Y, Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19: 55-71.
- [37] Gérard P. Gut microbiota and obesity [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73: 147-162.
- [38] Gomes AC, Hoffmann C, Mota JF. The human gut microbiota: metabolism and perspective in obesity [J]. *Gut Microbes*, 2018, 9: 308-325.
- [39] Su Y, Li J, Wu L, et al. Polysaccharides from TCM herbs exhibit potent anti-obesity effect by mediating the community structure of gut microbiota [J]. *Pharmazie*, 2021, 76: 473-479.
- [40] Wang Z, Lu J, Zhou J, et al. Modulation of the gut microbiota by Shen-Yan-Fang-Shuai Formula improves obesity induced by high-fat diets [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 564376.
- [41] Sun Y, Wang M, Zhang SJ, et al. Effects of Dachaihu decoction and its "prescription elements" on intestinal flora of nonalcoholic fatty liver disease model rats [J]. *J Tradit Chin Med*, 2020, 6: 97-105.
- [42] Li WL, Zheng HC, Bukuru J, et al. Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus [J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 92: 1-21.
- [43] Wang JH, Kim BS, Han K, et al. Ephedra-treated donor-derived gut microbiota transplantation ameliorates high fat diet-induced obesity in rats [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2017, 14: 555.
- [44] Wu TR, Lin CS, Chang CJ, et al. Gut commensal *Parabacteroides goldsteinii* plays a predominant role in the anti-obesity effects of polysaccharides isolated from *Hirsutella sinensis* [J]. *Gut*, 2019, 68: 248-262.
- [45] Xu Y, Wang N, Tan HY, et al. Function of *Akkermansia muciniphila* in obesity: interactions with lipid metabolism, immune response and gut systems [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 219.
- [46] Cani PD, De Vos WM. Next-generation beneficial microbes: the case of *Akkermansia muciniphila* [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 1765.
- [47] Shin NR, Lee JC, Lee HY, et al. An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice [J]. *Gut*, 2014, 63: 727-735.
- [48] Dong C, Yu J, Yang Y, et al. Berberine, a potential prebiotic to indirectly promote *Akkermansia* growth through stimulating gut mucin secretion [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 139: 111595.
- [49] Zhang X, Zhao Y, Xu J, et al. Modulation of gut microbiota by berberine and metformin during the treatment of high-fat diet-induced obesity in rats [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 14405.
- [50] Yang S, Li D, Yu Z, et al. Multi-pharmacology of berberine in atherosclerosis and metabolic diseases: potential contribution of gut microbiota [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 709629.