国家项目点击

DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.09.004

整合肠道菌群和代谢组学探究山茱萸多糖干预2型糖尿病的作用机制

张文静[1],尚子慧[1],孙孝亚[1],陈随清[1,2],崔永霞[1],吴明侠[1]
(1.河南中医药大学药学院,河南 郑州 450046;2.河南中医药大学豫药全产业链研发河南省协同创新中心,河南 郑州 450046)

摘要:目的 基于肠道菌群-宿主代谢,深入探究山茱萸多糖干预2型糖尿病的作用机制。方法 采用高糖高脂饲料结合小剂量腹腔注射链脲佐菌素(Streptozocin,STZ)的方法建立2型糖尿病模型。对各组大鼠药效指标进行检测,利用16S rDNA测序技术检测各组大鼠肠道菌群结构,结合GC-MS技术测定短链脂肪酸(Short-Chain Fatty Acids,SCFAs)的含量,并采用Western Blot方法检测肝脏组织中G蛋白偶联受体43(G-Protein coupled Receptor 43,GPR43)、G蛋白偶联受体41(G-Protein coupled Receptor 41,GPR41)、胰高血糖素样肽-1(Glucagon-Like Peptide-1,GLP-1)蛋白水平。使用UPLC-MS/MS技术对各组动物粪便进行小分子代谢组学研究,对肠道菌群与差异代谢物进行相关性分析。结果药效指标检测结果显示,山茱萸多糖能显著降低2型糖尿病大鼠的血糖、血脂和炎症因子水平;肠道菌群测序结果显示,山茱萸多糖对2型糖尿病大鼠的菌群多样性有显著改善,门水平上,对厚壁菌门、拟杆菌门、疣微菌门和放线菌门丰度均有不同程度回调,厚壁菌门/拟杆菌门的比值显著升高($P<0.05$);属水平上,乳杆菌属、阿克曼氏菌、拟杆菌属和Muribaculaceae丰度均有所增加;SCFAs及关键代谢通路测定结果显示,2型糖尿病大鼠粪便中SCFAs含量均显著下降($P<0.01$),GPR43、GPR41、GLP-1蛋白表达显著降低($P<0.01$),山茱萸多糖干预后,SCFAs含量均显著增加($P<0.05$,$P<0.01$),GPR41、GPR43、GLP-1蛋白表达显著升高($P<0.01$);代谢组学筛选出46个模型组和对照组组间显著变化($P<0.05$)的差异代谢物,主要富集到鞘脂代谢、类固醇生物合成等19条代谢通路;联合分析结果显示,肠道菌群对鞘氨醇等差异代谢物具有显著调节作用,涉及鞘脂代谢和类固醇生物合成等代谢通路。结论 山茱萸多糖可以通过调节肠道菌群结构影响SCFAs、鞘氨醇等代谢物水平,进而调节短链脂肪酸代谢、鞘脂代谢和类固醇生物合成等代谢通路,提高GPR43、GPR41、GLP-1蛋白的表达,调节大鼠的血糖血脂水平,从而调节糖脂代谢及肠道紊乱,抑制机体炎症反应,减轻胰岛素抵抗,发挥治疗2型糖尿病的作用。

关键词:山茱萸多糖;肠道菌群;短链脂肪酸;代谢组学;2型糖尿病
中图分类号:R255.4 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)09-0019-12

Exploring Mechanism of Shanzhuyu(Corni Fructus) Polysaccharides Integrating in Type 2 Diabetes Based on Intestinal Flora and Metabolomics

ZHANG Wenjing[1],SHANG Zihui[1],SUN Xiaoya[1],CHEN Suiqing[1,2],CUI Yongxia[1],WU Mingxia[1]
(1. College of Pharmacy,Henan University of Chinese Medicine,Zhengzhou 450046,Henan,China;
2. Collaborative Innovation Center of Research and Development on the Whole Industry Chain of Yu-Yao,
Henan University of Chinese Medicine,Zhengzhou 450046,Henan,China)

Abstract:*Objective* This study is based on intestinal flora-host metabolism and deeply explores the mechanism of Shanzhuyu(Corni Fructus) polysaccharides in type 2 diabetes. *Methods* A type 2 diabetes model was established by high sugar and high fat feed combined with a small dose of intraperitoneal injection of streptozocin(STZ). The pharmacoefficiency index of the rats in each group was detected,and the intestinal microbial structure of the rats in each group was detected by 16S rDNA sequencing technology,and the content of short-chain fatty acids(SCFAs) was measured in combination with GC-MS technology. The Western Blot method was used to detect the protein levels of G-protein coupled receptor 43(GPR43),G-protein coupled receptor 41(GPR41) and glucagon-like peptide-1(GLP-1) in liver tissues. Small molecule metabolomics study was performed on animal feces in each group using UPLC-MS/MS technology,and the correlation analysis was conducted on intestinal microbiota and differential metabolites. *Results* The results of the drug efficacy index test showed that Shanzhuyu(Corni Fructus) polysaccharides could significantly reduce the blood sugar,blood lipids and inflammatory factors in the rats with type 2 diabetes. The results of intestinal flora sequencing showed that Shanzhuyu(Corni Fructus) polysaccharides significantly improved the bacterial diversity of type 2 diabetes rats. At the level of phylum,the abundance of Firmicutes,Bacteroides,Varves and Acti-

基金项目:国家重点研发计划项目(2023YFC3504000);河南省重大科技专项(221100310400);河南省科技发展计划项目(242102310524);郑州市科技协同创新项目(2023XTCX053);河南中医药大学博士科研基金项目(BSJJ2022-04)
作者简介:张文静(2000-),女,河南南阳人,硕士在读,研究方向:中药药效物质基础及中药质量控制。
通讯作者:崔永霞(1979-),女,河南商丘人,副教授,硕士研究生导师,博士,研究方向:中药药效物质基础及药品质量评价。E-mail:1020076356@qq.com。
吴明侠(1971-),女,浙江东阳人,副教授,硕士研究生导师,博士,研究方向:中药质量分析及药效物质基础。E-mail:mxwu711@163.com。

nomycetes all had different degrees of correction, and the ratio of Firmicutes/Bacteroides increased significantly ($P < 0.05$). At the level of genus, Lactobacillus, Akermans, Bacteroides and Muribaculaceae increased. The results of SCFAs and key metabolic pathways showed that the content of SCFAs in the feces of type 2 diabetes rats had significantly decreased ($P < 0.01$), the protein expressions of GPR43, GPR41 and GLP-1 were significantly reduced ($P < 0.01$), and after the intervention of Shanzhuyu (Corni Fructus) polysaccharides, the SCFAs content was significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the protein expressions of GPR41, GPR43 and GLP-1 were significantly increased ($P < 0.01$). Metabolomics screened differential metabolites with significant changes ($P < 0.05$) among 46 model and control groups, mainly enriched 19 metabolic pathways such as sphingolipid metabolism and steroid biosynthesis. The results of the joint analysis showed that intestinal flora had a significant regulatory effect on differential metabolites such as sphingolipid metabolism and steroid biosynthesis, involving metabolic pathways such as sphingolipid metabolism and steroid biosynthesis. *Conclusion* Shanzhuyu (Corni Fructus) polysaccharides can affect the levels of metabolites such as SCFAs and sphingosine by regulating the intestinal microbiota structure, and then regulate the metabolism pathways such as short-chain fatty acid metabolism, sphingolipid metabolism and steroid biosynthesis, improve the protein expressions of GPR43, GPR41 and GLP-1, regulate the blood sugar and blood lipid levels of the rats, thereby regulating glycolipid metabolism and intestinal disorders, inhibiting the body's inflammatory response, reducing insulin resistance and playing a role in treating type 2 diabetes.

Keywords: Shanzhuyu (Corni Fructus) polysaccharides; intestinal flora; short-chain fatty acids; metabolomics; type 2 diabetes mellitus

山茱萸始载于《神农本草经》，为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis Sieb.* et Zucc. 的干燥成熟果肉。多糖作为山茱萸的主要活性成分，具有显著降血糖作用，但相关研究多局限于药理指标的测定，未能全面阐述山茱萸多糖干预2型糖尿病的作用机制。肠道菌群作为宿主肠道微生态的重要组成部分，其结构组成、能量代谢等均可影响多种代谢性疾病的发生与发展。大量研究报道肠道菌群与2型糖尿病的发生联系密切[1]。短链脂肪酸（Short-Chain Fatty Acids，SCFAs）是肠道菌群的重要代谢产物，可作为中间介质通过多途径、多靶点参与机体的糖脂代谢等反应，影响2型糖尿病的发生发展[2]。非靶代谢组学研究方法与其他技术相比，能同时检测粪便样本各代谢产物的含量水平，通过对机体差异代谢物的全面定性和定量分析，可从分子水平上阐明复杂疾病的生理病理变化及药物干预机制，与中医的整体观思想相一致。本课题组前期药理学研究从病理切片、药效指标和血清代谢组学等方面初步阐明了山茱萸多糖对2型糖尿病的干预作用[3]，但对2型糖尿病大鼠肠道菌群-宿主代谢的整体调节作用未见报道。

1 材料

1.1 动物

SPF级SD雄性大鼠70只，4～5周龄，体质量（120±10）g，购自浙江维通利华实验动物技术有限责任公司，动物许可证号SCXK（浙）2019-0001。动物实验经河南中医药大学实验动物伦理委员会批准（批准号DWLL202206094），动物饲养于河南中医药大学SPF级动物实验中心，温度为（25±2）℃，相对湿度为（55±5）%，昼夜交替照明，时长12 h。

1.2 药材

山茱萸购自河南西峡宛西制药中药材种植事业部，经河南中医药大学药学院陈随清教授鉴定为山茱萸科植物山茱萸 *C. officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉，质量符合2020年版《中华人民共和国药典》规定。

1.3 试剂

高糖高脂饲料（江苏协同医药生物工程有限责任公司，批号：20220617）；链脲佐菌素（Sigma，批号：20141204）；盐酸二甲双胍片（中联制药有限公司，批号：R171224）；大鼠胰岛素（INS）ELISA试剂盒（南京建成生物工程研究所，批号：H203-1-2）；乙酸（上海麦克林生化科技有限公司，批号：C14138188，纯度≥99.5%）、丙酸（上海麦克林生化科技有限公司，批号：C10526875，纯度≥99.5%）、丁酸（上海麦克林生化科技有限公司，批号：C10627718，纯度≥99.5%）、异丁酸（上海麦克林生化科技有限公司，批号：C10915102，纯度≥99.5%）、戊酸（上海麦克林生化科技有限公司，批号：C10439149，纯度≥99.5%）、异戊酸（上海麦克林生化科技有限公司，批号：C10839162，纯度≥99.5%）、己酸（上海麦克林生化科技有限公司，批号：C12913990，纯度≥99.5%）和2-甲基戊酸标准品（Sigma，批号：83296PJV，纯度≥99.5%）；浓盐酸（天津市富宇精细化工有限公司，批号：210624）；甲基叔丁基醚（MREDA，批号：095170）；PVDF膜（0.45 μm，Servicebio，批号：0000320583）；无蛋白快速封闭液（Servicebio，批号：CR2308055）；ECL化学发光试剂盒（Servicebio，批号：G2014）；免冰浴快速转膜缓冲液（Servicebio，批号：GC2305001）；1×SWE快速高分辨电泳缓冲液（Servicebio，批号：GC2305003）；TBST缓冲液（Servicebio，批号：GC2305002）；一抗稀释液（Servicebio，批号：GA2305016）；Western二抗稀释液（Servicebio，批号：GA2305032）；一抗二抗洗脱液（Servicebio，批号：GA2305032）；GPR41（Bioss，批号：19952-1-AP）；GPR43（GeneTex，批号：GTX00823）；GLP-1（Servicebio，批号：58117051004）；ACTIN（Servicebio，批号：20211116）；HRP-山羊抗兔（Servicebio，批号：AC230313001）。

1.4 仪器

超纯水制备仪（Millipore Merk，Milli-QPOD）；低温研磨仪（Servicebio，KZ-Ⅲ-FP）；涡旋混匀仪（Servicebio，SMV-4500B）；磁力搅拌器（Servicebio，MS-150）；台式高速冷冻离心机（DRAGONLAB，D3024R）；掌上离心机（Servicebio，MS6000）；多功能型摇床（Servicebio，DS-3D100）；垂直电泳仪（Servicebio，SVE-2）；转印电泳仪（Servicebio，SVT-2）；超声波细胞破碎仪（宁波新芝生物，JY92-11N）；化学发光仪（CLINX，6100）；酶标仪（Rayto，RT-6100）；气质联用仪（ThermoFisher，TSQ 8000 Evo）；液质联用仪（ThermoFisher，LTQ-Orbitrap XL）。

2 方法

2.1 山茱萸多糖的提取、2型糖尿病大鼠模型的构建、分组及给药

同文献[3]。未参与造模的大鼠作为空白对照组（NC），造模成功的大鼠随机分为模型空白组（MOD）、二甲双胍组（MET）、山茱萸多糖低剂量组（L-CFP、75 mg·kg^{-1}）、山茱萸多糖中剂量组（M-CFP、150 mg·kg^{-1}）和山茱萸多糖高剂量

组(H－CFP、300 mg·kg^{-1})。NC组和MOD组大鼠每日上午灌胃10 mL·kg^{-1}生理盐水,各给药组大鼠灌胃相应剂量药物,连续给药28 d。给药期间,NC组大鼠给予普通饲料,MOD组和各给药组大鼠给予高糖高脂饲料。

2.2 样品采集及处理

末次给药后1 h麻醉,对大鼠进行腹主动脉取血,收集结肠内容物。血液置于抗凝剂浸润的离心管中,离心10 min(4 ℃,3000 r/min)后,吸取上层血清分装,置－80 ℃冰箱保存,备用。结肠内容物于－80 ℃冰箱冷冻2 h,部分干冰送检肠道菌群测序,其余－80 ℃冰箱贮存,备用。

2.3 药效指标检测

每周称量记录大鼠体质量,并测定大鼠随机血糖值。将－80 ℃冻存的血清样品于4 ℃复溶,按照试剂盒操作说明测定血清中血脂指标TC、TG、LDL－C和HDL－C水平,肝功能指标ALT、AST水平,炎症因子IL－1β、IL－6和TNF－α含量,抗氧化指标SOD和MDA水平。

2.4 肠道菌群16S rDNA测序

按照试剂盒操作,提取结肠内容物中总DNA,并检测总DNA的纯度和浓度,进行PCR扩增,所选扩增区域为16S rDNA的V3－V4区。对扩增产物进行纯化和定量检测,构建Miseq文库,上机测序得到原始数据。

2.5 SCFAs的测定

取粪便样品50 mg,加入500 μL生理盐水,超声2 min,4 ℃ 14 000 r·min^{-1}离心15 min。取上清液200 μL,加20 μL 50%的盐酸和20 μL的内标,涡旋1 min后置于4 ℃冰箱中10 min,加入冰冻的甲基叔丁基醚400 μL,涡旋3 min,4 ℃ 14 000 r·min^{-1}离心15 min,取上清液200 μL转移至进样瓶中,利用GC－MC进样分析。

气相色谱条件:色谱柱为Thermofisher TG－WAXMS(30 m×0.25 mm,0.25 μm),进样量2 μL,进样口温度250 ℃,分流比10∶1,分离采用程序升温,条件:初始柱温70 ℃维持2 min,以10 ℃·min^{-1}升温至150 ℃,再以15 ℃·min^{-1}升温至200 ℃,最后20 ℃·min^{-1}升温至230 ℃,保持2 min。

质谱条件:电子轰击电离(EI)源,离子源温度280 ℃,传输线温度250 ℃,电子能量70 eV,溶剂延迟6.5 min,各短链脂肪酸的检测模式为SIM扫描模式。

2.6 关键靶点代谢通路的测定

肝脏组织加入裂解液提取蛋白并收集蛋白;采用BCA法测定各组样本的蛋白浓度数值;沸水浸泡变性后聚丙烯酰胺凝胶电泳,半干转法转至PVDF膜。5%脱脂奶粉封闭。一抗孵育按照抗体说明书进行操作,4 ℃过夜。二抗孵育、洗脱后,加入ECL发光溶液,启动预设程序开始ECL化学发光,待曝光完成后,保存图像为TIF格式的原始图片,用AIWBwellTM分析软件进行数据分析。

2.7 粪便代谢组学分析

2.7.1 大鼠粪便样品及质控样本制备 精密称取各组粪便各100 mg,加入9倍量甲醇－乙腈(1∶1),冰浴超声提取30 min,离心15 min(4 ℃ 13 600 r/min),取上清液,进样分析。精密称取各组粪便样本各25 mg,涡旋混匀,同法处理,即得粪便质控样本(Quality Control,QC),用于系统稳定性的考察。

色谱条件:Poroshell 120 SB－Aq(1.9 μm,2.1 mm×100 mm),Poroshell 120 SB－Aq预柱(2.7 μm,2.1 mm×5 mm),流动相为0.1%甲酸水(A)～乙腈(B)。梯度洗脱:0～5 min,2% B;5～7 min,2%～60% B;7～12 min,60%～100% B;12～15 min,100% B;15～17 min,100%～2% B;17～20 min,2% B。柱温35 ℃;流速0.3 mL/min;进样量1 μL。

质谱条件:采用ESI电喷雾离子源,扫描模式:Full Mass,分辨率为50 000;扫描模式:Dependent－MS2,分辨率为60 000,碰撞能量为25%,扫描范围均为50～1000 Da。正离子模式:鞘气流速:40 arb;辅助气流速:10 arb;离子喷射电压4.2 kV;离子传输管温度为300 ℃;毛细管电压23 V;管镜电压90 V。负离子模式:鞘气流速:40 arb;辅助气流速:10 arb;离子喷射电压3.5 kV;离子传输管温度为300 ℃;毛细管电压－35 V;管镜电压－78.2 V。

2.7.2 系统稳定性考察 采用质控样本(QC)评价系统稳定性。序列进样前先连续进6针QC样本。在后续的序列中每6针样品需运行1针QC样本,用于监测系统的稳定性和重复性,

2.8 数据分析

肠道菌群16S rDNA测序在对原始数据进行拼接、质控、过滤后得到有效数据,再进行操作分类单元(Operational Taxonomic Units,OTUs)聚类和物种分类分析。短链脂肪酸含量测定的原始数据用TraceFinder软件积分后导出数据,去除空白实验中存在的变量,得峰面积。对各样品的峰面积进行归一化处理,得各成分相对含量。数据统计分析采用SPSS 26.0软件,多组以上比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD－t检验,所得结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。

代谢组学采用MSDIAL软件对原始数据进行预处理;采用SIMCA－P 16对数据矩阵进行多元统计分析;通过主成分分析(Principal Component Analysis,PCA)建立大鼠代谢轮廓;基于PCA进行正交偏最小二乘法判别分析(Orthogonal Partial Least Squares－Discriminant Analysis,OPLS－DA),根据差异变量权重值(Variable Important in the Projection,VIP＞1.0)、组间变化倍数(Fold Change,FC＜0.8或＞1.2)和t检验(P＜0.05)筛选差异性代谢物;根据HMDB、Mzcloud、Pubchem、MassBank等在线数据库鉴定差异代谢物;将鉴定得到的差异代谢物导入MetaboAnalyst 6.0在线网址中进行通路富集。

3 实验结果

3.1 药效指标检测结果

山茱萸多糖可以降低2型糖尿病大鼠体质量和血糖水平,改善肝损伤;降低血清中TC、TG、LDL－C、IL－6、IL－1β、TNF－α、MDA水平和AST、ALT活性(P＜0.05、P＜0.01),升高HDL－C水平和SOD活性(P＜0.05)。结果见文献[3]。

3.2 肠道菌群16S rDNA测序分析

3.2.1 α多样性分析 采用稀释曲线(Rarefaction Curve)和丰度等级曲线(Rank abundance curve)研究组内样品多样性。稀释曲线逐渐趋于平坦,表示测序数据量合理,较多的数据量也只能产生少量新物种(OTUs),见插页Ⅴ图1－A。Rank－Abundance曲线逐渐趋向平缓,表明物种丰富度高且分布相对均匀,见插页Ⅴ图1－B。

对α多样性指数进行分析,见表1。与NC组相比,MOD组的Chao1指数(Chao1 Index)、香农指数(Shannon Index)和辛普森指数(Simpson Index)均有所降低,提示2型糖尿病大鼠肠道菌群多样性和丰富度均发生变化;与MOD组相比,H－CFP组的α多样性指数均升高,说明山茱萸多糖能增加2型糖尿病大鼠肠道菌群的多样性和丰富度。

3.2.2 β多样性分析 对β多样性进行主坐标分析(Principal Coordinates Analysis,PCoA)和相似性分析(Analysis Of Similarities,ANOSIM),判断不同样本的菌群是否存在差异性。由插页Ⅴ图1－C可知,NC组和MOD组物种组成差异较大;与NC组相比,其他各组分布较为分散且样本之间距离大于NC组,与MOD组相比,H－CFP组样本分布更为集中,样本间距距离小,

且MET组和H－CFP样本向NC组方向有偏移趋势。由插页Ⅴ图1－D可知,组间样品差异较大,同时组内样品差异较小,表明分组效果较好。

表1 α多样性比较结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Chao1	Shannon	Simpson
NC	6	451.96±69.38	6.15±0.52	0.96±0.02
MOD	6	392.87±59.11	5.65±0.10	0.95±0.01
MET	6	380.04±20.23	5.63±0.48	0.94±0.02
L－CFP	6	361.46±92.45	5.59±0.85	0.88±0.13
M－CFP	6	363.66±11.66	5.61±0.26	0.94±0.02
H－CFP	6	408.27±34.09	5.81±0.71	0.96±0.01

3.2.3 各组大鼠肠道菌群物种组成 如插页Ⅴ图1－E和插页Ⅴ图1－F所示,在门水平上,肠道菌群组成主要包括厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、热脱硫杆菌门(desulfobacterota)、放线菌门(Actinobacteriota)、变形菌门(Proteobacteria)等。其中各组菌群中以厚壁菌门和拟杆菌门丰度较高;与NC组相比,MOD组的厚壁菌门、热脱硫杆菌门和变形菌门丰度增加,拟杆菌门、疣微菌门和放线菌门丰度降低,拟杆菌门/厚壁菌门丰度显著降低($P<0.05$);山茱萸多糖干预后,各组厚壁菌门丰度均有所降低,拟杆菌门、疣微菌门和放线菌门丰度均有不同程度回调,拟杆菌门/厚壁菌门丰度显著升高($P<0.05$)。

如插页Ⅴ图1－G和插页Ⅴ图1－H所示,在属水平上,NC组大鼠优势菌属是双歧杆菌属(Bifidobacterium)、乳杆菌(Lactobacillus)、阿克曼菌(Akkermansia)、拟杆菌(Bacteroides)、罗布氏菌(Romboutsia)和Muribaculaceae。与NC组相比,MOD组大鼠菌群中上述菌属丰度均有所下降,而异杆菌属(Allobaculum)和瘤胃球菌(Ruminococcus)丰度有所增加。与MOD组相比,MET组大鼠菌群中阿克曼氏菌和拟杆菌属丰度增加,异杆菌属和瘤胃球菌属丰度下降。山茱萸多糖给药干预后,各组大鼠菌群中乳杆菌属、阿克曼氏菌、拟杆菌属和Muribaculaceae丰度均有不同程度回调。

3.2.4 各组大鼠组间关键肠道菌群筛选 利用线性判别分析效应大小(Linear Discriminant Analysis Effect Size,LEfSe)对各组肠道菌群的丰度进行比较,以LDA值>3.5为标准,寻找在丰度上存在显著差异的微生物种类。结果表明,差异菌群包括Muribaculaceae、优杆菌(Eubacterium)、另枝菌(Alistipes)、嗜胆菌(Bilophila)、肠杆菌(Enterobacteriaceae)、脱硫弧菌(Desulfovibrionaceae)、毛螺菌(Lachnospiraceae)、瘤胃球菌、罗氏菌(Roseburia)等,主要为厚壁菌门和变形菌门等。见插页Ⅵ图2。

3.3 SCFAs含量测定及SCFAs－GPR41/43－GLP－1通路验证

3.3.1 SCFAs测定结果 与NC组相比,MOD组的7种短链脂肪酸含量均显著降低($P<0.01$);与MOD相比,7种短链脂肪酸含量均有不同程度升高,其中L－CFP组中的戊酸含量显著升高($P<0.05$),M－CFP组中的乙酸、丙酸、丁酸和异丁酸含量显著升高($P<0.05$,$P<0.01$),H－CFP组除乙酸和己酸外短链脂肪酸含量均显著升高($P<0.05$)。见表2。

3.3.2 SCFAs－GPR41/43－GLP－1代谢通路测定结果 综合高剂量组的药理药效指标及对SCFAs的调节作用,选用H－CFP组进行关键靶点代谢通路的测定。结果显示,与NC组相比,MOD组大鼠肝脏细胞中GPR43、GPR41和GLP－1的蛋白表达显著降低($P<0.01$);与MOD组比较,MET组和H－CFP组大鼠肝脏细胞中GPR43、GPR41和GLP－1蛋白表达显著升高($P<0.01$),见图3、图4。

3.4 粪便代谢组学分析

3.4.1 多元统计分析 各组大鼠粪便样本的PCA分析图见插页Ⅵ图5。由图可知,QC样本在正负离子模式下均聚合较好,各组样本在95%的置信区间内均可以较好地聚为一类,且各组之间均有分离趋势。由PLS－DA得分图可知,NC组和MOD组之间出现明显的分离趋势,说明2型糖尿病大鼠粪便代谢轮廓发生了显著变化;山茱萸多糖各剂量给药组远离MOD组,逐渐向NC组趋近,说明山茱萸多糖给药组干预的2型糖尿病大鼠粪便代谢物水平逐渐向正常方向回调,表明山茱萸多糖对2型糖尿病大鼠机体代谢紊乱具有改善作用。PLS－DA模型中,粪便样本正离子模式下$R^2X=0.648$,$R^2Y=0.926$,$Q^2=0.725$;负离子模式下$R^2X=0.71$,$R^2Y=0.601$,$Q^2=0.552$,说明模型有良好的预测能力。200次置换检验结果显示,置换检验随机模型的R^2截距值在0.3~0.5,Q^2的截距值小于0,说明不存在过拟合现象。见插页Ⅶ图6。

3.4.2 差异代谢物的筛选和鉴定 将NC组与MOD组,MOD组与L－CFP组、M－CFP组和H－CFP组进行OPLS－DA分析,结果见插页Ⅶ图7。对差异代谢物进行筛选,设置条件为VIP>1.0、FC<0.8或>1.2且$P<0.05$,并绘制火山图,见插页Ⅶ图8。对差异代谢物进行鉴定得到46个与2型糖尿病风险相关的差异代谢物,正离子模式下有27个,负离子模式下有19个,主要包括脂肪酸、胆汁酸、溶血磷脂类和氨基酸类等代谢物。对比山茱萸多糖给药组与模型组中差异代谢物的含量,发现山茱萸低剂量组可回调20个代谢物;山茱萸中剂量组可回调22个代谢物;山茱萸高剂量组可回调26个代谢物,其中山茱萸多糖给药组大鼠粪便中鞘氨醇(Sphingosine)、植物鞘氨醇(Phytosphingosine)、二氢鞘氨醇(Sphinganine)、胆固醇(Cholesterol)和α－亚麻酸(alpha－Linolenic acid)等代谢物含量显著下降($P<0.05$),亚油酸(Linoleic Acid)等代谢物含量显著升高($P<0.05$)。用代谢物含量绘制热图,见插页Ⅸ图9。

3.4.3 代谢通路分析 将差异代谢物导入MetaboAnalyst 6.0网站进行代谢通路分析。选取Impact>0.1的代谢通路进行分析,见插页Ⅸ图10。2型糖尿病大鼠粪便中亚油酸代谢

表2 大鼠粪便样品中短链脂肪酸含量($\bar{x} \pm s$) 单位:mg·g^{-1}

组别	n	NC	MOD	L－CFP	M－CFP	H－CFP
乙酸	6	4.465±1.374	0.990±0.529##	1.490±0.557	2.281±0.806*	1.722±0.271
丙酸	6	1.166±0.147	0.039±0.018##	0.133±0.098	0.253±0.189**	0.207±0.095*
异丁酸	6	0.077±0.040	0.006±0.003##	0.022±0.006	0.031±0.015*	0.033±0.014*
丁酸	6	0.542±0.121	0.015±0.006##	0.070±0.046	0.149±0.117*	0.147±0.039*
异戊酸	6	0.074±0.036	0.004±0.003##	0.019±0.017	0.019±0.006	0.028±0.019*
戊酸	6	0.066±0.037	0.004±0.002##	0.027±0.015*	0.025±0.014	0.030±0.016*
己酸	6	0.016±0.009 9	0.001±0.000 2##	0.002±0.000 3	0.001±0.000 2	0.002±0.000 2

注:##与NC组比较,$P<0.01$;*与MOD组比较,$P<0.05$;**与MOD组比较,$P<0.01$。

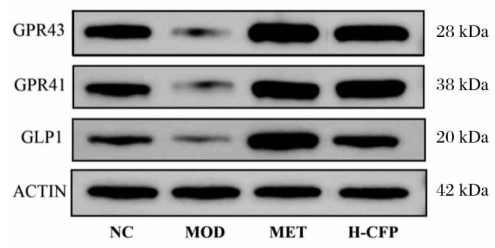


图3 GPR43、GPR41和GLP-1蛋白的表达

(Linoleic acid metabolism)、α-亚麻酸代谢(alpha-Linolenic acid metabolism)、鞘脂代谢(Sphingolipid metabolism)、类固醇生物合成(Steroid biosynthesis)等19条代谢通路发生紊乱。山茱萸调节肠道菌群后,鞘脂代谢-log*P*值和Impact值最大,说明鞘脂代谢在山茱萸多糖调节肠道菌群干预2型糖尿病的过程中发挥关键作用。

3.5 相关性分析

3.5.1 SCFAs相关性分析 将肠道菌群和SCFAs、SCFAs和药效指标分别进行相关性分析,结果见插页X图11。

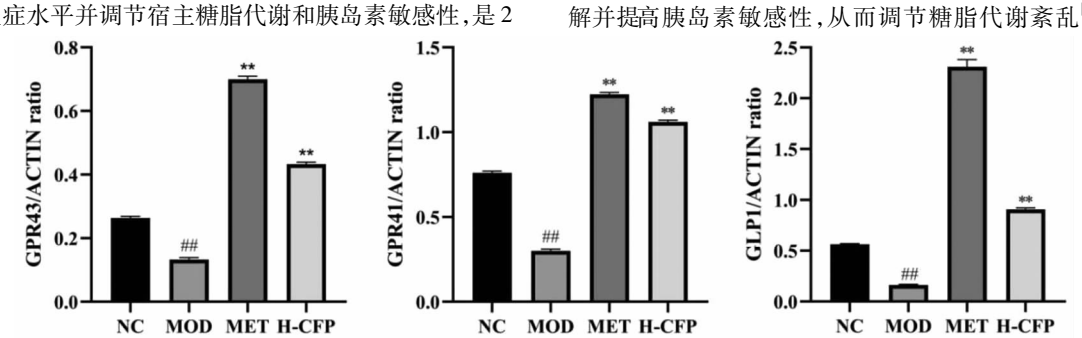
3.5.2 差异代谢物联合分析 为对肠道菌群测序结果进行深层次挖掘,将差异代谢物联合药效指标、差异代谢物联合肠道菌群进行相关性分析。联合分析结果显示,肠道菌群对粪便中鞘氨醇、二氢鞘氨醇、胆固醇等7个代谢物具有显著调节作用。Muribaculaceae、优杆菌、毛螺菌、罗氏菌与鞘脂代谢涉及代谢物鞘氨醇和二氢鞘氨醇呈负相关,另枝菌、嗜胆菌、肠杆菌、脱硫弧菌、瘤胃球菌与鞘脂代谢涉及代谢物鞘氨醇和二氢鞘氨醇呈正相关,鞘氨醇和二氢鞘氨醇的减少与Muribaculaceae、优杆菌、毛螺菌、罗氏菌丰度的升高和另枝菌、嗜胆菌、肠杆菌、脱硫弧菌、瘤胃球菌的降低有关;Muribaculaceae、优杆菌、毛螺菌、罗氏菌与类固醇代谢涉及代谢物胆固醇呈负相关,与另枝菌、嗜胆菌、肠杆菌、脱硫弧菌、瘤胃球菌丰度与类固醇代谢涉及代谢物胆固醇呈正相关,胆固醇的减少与Muribaculaceae、优杆菌、毛螺菌、罗氏菌丰度的升高和另枝菌、嗜胆菌、肠杆菌、脱硫弧菌、瘤胃球菌丰度的降低有关。联合分析结果显示,鞘脂代谢涉及代谢物鞘氨醇和二氢鞘氨醇与IL-6、TNF-α、SOD、MDA、ALT和HDL-C等药效指标呈正相关。见插页X图12。

4 讨论

肠道菌群被称为“人类第二基因组”,参与机体代谢、免疫调节、能量吸收等过程,对于维持宿主健康具有重要意义。肠道菌群紊乱的主要诊断标准即为拟杆菌门与厚壁菌门丰度值比例降低[4]。乳杆菌可通过调节胰岛素信号传导以及糖脂代谢等途径来降低血糖水平,通过促进胰岛素表达或降低磷酸化水平改善胰岛素抵抗[5-6]。阿克曼菌通过产生乙酸、丙酸和丁酸等降低炎症水平并调节宿主糖脂代谢和胰岛素敏感性,是2型糖尿病的潜在治疗靶点[7-8]。拟杆菌属通过产生乙酸和丙酸抑制嗜中性粒细胞和巨噬细胞释放促炎细胞因子以维持肠道内环境稳定[9]。Muribaculaceae对多糖有较强的代谢能力,可产生乙酸和丙酸,与双歧杆菌和乳杆菌属协作可产生乙酸、丙酸、丁酸和戊酸,增加SCFAs的种类[10]。优杆菌可产生丙酸和丁酸,促进胰高血糖素样肽-1(GLP-1)和促食欲肽(PYY)分泌,改善胰岛素抵抗[11]。另枝菌通过释放脂多糖LPS促进炎症反应并降低产丁酸细菌的丰度[12]。嗜胆菌可引起全身性炎症反应,在糖尿病等慢性炎症相关代谢性疾病中具有潜在作用[13]。肠杆菌诱导炎症因子分泌,增加肠道通透性、促进炎症[14-15]。脱硫弧菌生成炎症调控分子硫化氢(H_2S)从而引发或加剧炎症反应[16-17]。毛螺菌通过产生先天免疫细胞的抗原和免疫调节代谢物减轻炎症和改善胰岛素抵抗[18]。瘤胃球菌能够通过促进机体炎症和氧化应激反应影响肠道健康[19]。罗氏菌通过丁酸和鞭毛蛋白调节屏障稳态并释放免疫细胞和细胞因子[20]。山茱萸多糖干预后,厚壁菌门/拟杆菌门的比值上升,拟杆菌门、疣微菌门和放线菌门丰度降低。在属水平上,乳杆菌、阿克曼氏菌、拟杆菌、Muribaculaceae、优杆菌、毛螺菌、罗氏菌丰度升高,另枝菌、嗜胆菌、肠杆菌、脱硫弧菌、瘤胃球菌丰度降低。结合IL-1β、IL-6β等炎症因子含量降低,推测山茱萸多糖调节肠道菌群结构降低炎症水平是其改善2型糖尿病的机制之一。

SCFAs能影响机体的血糖血脂水平,并对肠道的炎症和氧化反应起到抑制作用,是结肠细胞的主要能量来源,同时SCFAs能促进肝脏细胞增殖,改善肝脏通透性,增强肠道的免疫屏障[21]。乙酸、丙酸、丁酸占SCFAs总含量的90%左右。乙酸可由丙酮酸通过乙酰-CoA或Wood-Ljungdahl途径形成,能够作用于全身多脏器,调节宿主代谢水平,维持肠道菌群稳定性和多样性。丙酸的产生途径主要有琥珀酸或丙烯酸酯两种,主要有拟杆菌门和厚壁菌门参与。丙酸能够减少促炎因子的表达,提高肠道黏膜的屏障功能,在肝脏细胞内可通过参与三羧酸循环为肝脏供能。丁酸能抑制病原菌生长,减少炎症因子生成以及炎症对肠道上皮的损伤,维护肠道屏障[22-23]。山茱萸多糖干预后,乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸和异戊酸共6种短链脂肪酸含量显著上升,推测山茱萸多糖通过改变肠道菌群结构增加SCFAs含量,进而抑制炎症反应。

基于此,以SCFAs-GPR41/43-GLP-1糖脂代谢通路为切入点,深入研究山茱萸多糖干预2型糖尿病的作用机制。研究发现乙酸、丙酸和丁酸能够以同等速度激活GPR43,而GPR41主要被丙酸激活,其次是丁酸和乙酸[24]。GPR43和GPR41能够通过介导SCFAs的吸收,影响营养物质在肠道中的消化吸收;同时还能有效抑制机体炎症反应、加速脂肪的分解并提高胰岛素敏感性,从而调节糖脂代谢紊乱[25]。GLP-1



注:##与NC组比较,$P<0.01$;**与MOD组比较,$P<0.01$。

图4 GPR43、GPR41、GLP-1与ACTIN蛋白灰度值比例($n=6$)

能促进肝糖原合成及抑制糖异生,加快胰岛素的释放,调节糖脂代谢,对糖尿病起到控制作用。此外 GLP－1 分泌减少会导致肠道益生菌丰度降低,肠道炎症浸润情况加重,促进糖尿病的发生发展[26]。山茱萸多糖干预后,乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸和戊酸的含量显著增加,GPR43、GPR41、GLP－1 蛋白表达显著升高。提示山茱萸多糖可能通过增加肠道内 SCFAs 的含量,提高 GPR43、GPR41、GLP－1 蛋白的表达,抑制机体炎症反应。

鞘脂包括神经酰胺、鞘磷脂和鞘糖脂等,二氢鞘氨醇酰化为神经酰胺,神经酰胺水解去酰化生成鞘氨醇,鞘氨醇是鞘氨醇－1－磷酸(S1P)的前体。神经酰胺可通过诱导胰岛素抵抗、损害 β 细胞功能导致血糖稳态失衡和 2 型糖尿病的发生。YUN 等[27]发现胰岛 β 细胞功能受损会升高机体内鞘脂水平,从而使 2 型糖尿病的发病风险升高。鞘氨醇可利用脂多糖刺激巨噬细胞释放炎症因子诱导炎症。S1P 作为信号分子,可以通过与受体 S1P1 结合激活内皮细胞和巨噬细胞,释放促炎细胞因子并发挥抗炎作用[28－29]。结合药效指标检测结果,推测山茱萸多糖可能通过调节鞘脂代谢抑制炎症因子的释放干预 2 型糖尿病。此外,对肠道菌群与差异代谢物之间关系的分析表明,Muribaculaceae、罗氏菌、瘤胃球菌、脱硫弧菌、优杆菌、肠杆菌等肠道菌群与鞘脂代谢关系密切。山茱萸多糖调节肠道菌群结构,干预鞘脂代谢及 SCFAs－GPR41/43－GLP－1 糖脂代谢通路,调节大鼠的血糖血脂水平,从而调节糖脂代谢及肠道紊乱,抑制机体炎症反应,减轻胰岛素抵抗。

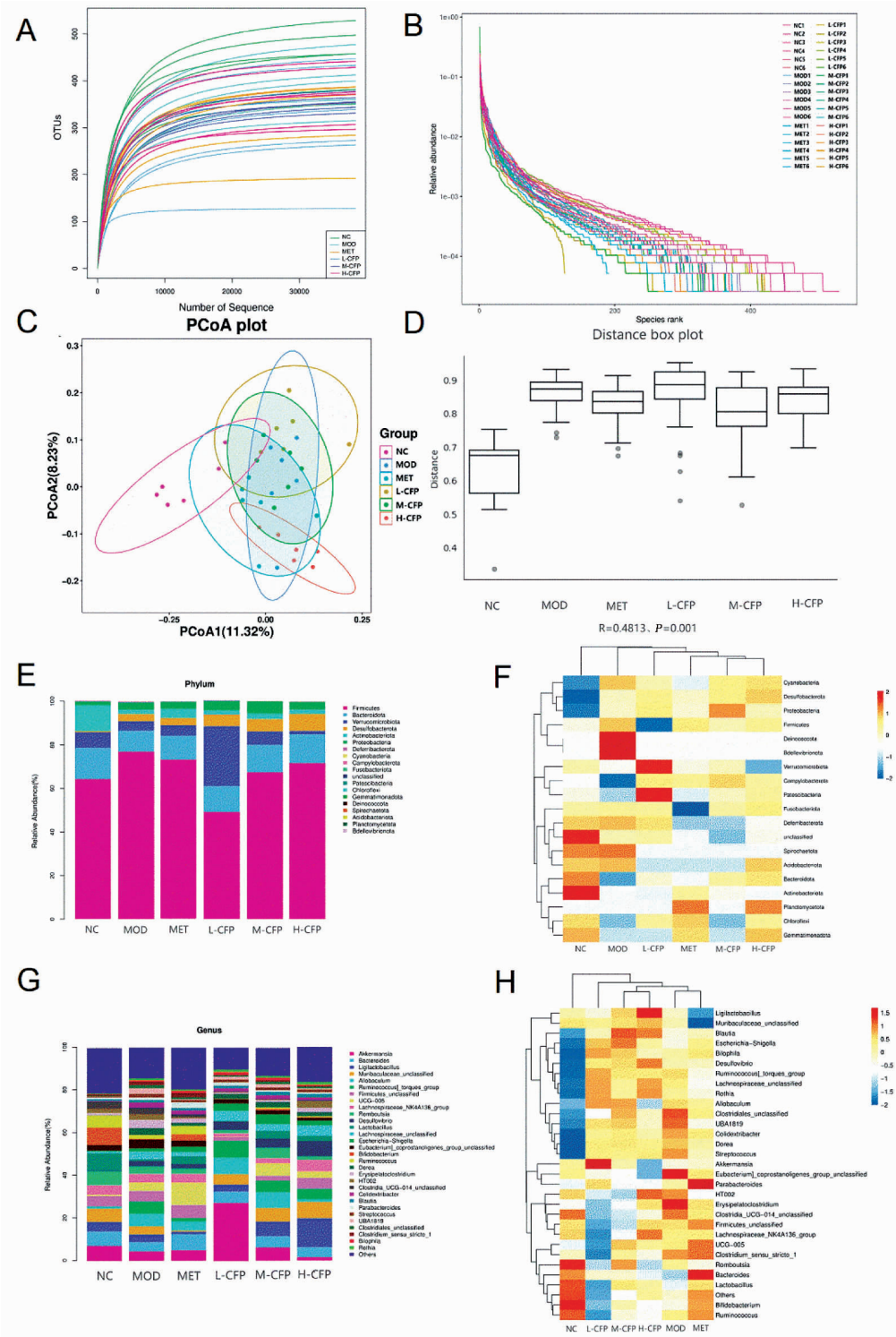
本文基于肠道菌群代谢初步探究了山茱萸多糖干预 2 型糖尿病的作用机制,但未从分子层面阐明山茱萸多糖调节肠道菌群的作用机制,对山茱萸多糖调节肠道菌群的具体机制解释有待深入。通过体外培养实验和体内定植实验验证肠道菌群调节鞘氨醇等差异代谢物的具体作用机制,探究山茱萸多糖调节肠道菌群的构效关系,对山茱萸多糖进行糖链修饰,使其靶向多种代谢通路,合成安全有效改性多糖,是未来的主要发展方向。

参考文献

[1] 邓小玲,石立力. 肠道菌群与益生菌和 2 型糖尿病关系的研究进展[J]. 国际老年医学杂志,2024,45(6):641－647.
[2] 姜荣生,张龙,管其凡,等. 短链脂肪酸在 2 型糖尿病中的作用研究进展[J]. 中国全科医学,2024,27(24):3031－3037.
[3] 崔永霞,尚子慧,侯亚迪,等. 基于血清代谢组学探究山茱萸多糖对 2 型糖尿病大鼠的干预机制[J]. 中草药,2024,55(9):2976－2986.
[4] CAMILLERI M, BOECKXSTAENS G. Irritable bowel syndrome: treatment based on pathophysiology and biomarkers[J]. Gut,2023,72(3):590－599.
[5] RODRIGUES R R,GURUNG M,LI Z P,et al. TransKingdom interactions between Lactobacilli and hepatic mitochondria attenuate western diet－induced diabetes[J]. Nat Commun,2021,12(1):101.
[6] 罗龙龙,任卫合,蔡林海,等. 乳酸菌改善糖尿病代谢作用机制研究进展[J]. 食品工业科技,2021,42(8):404－409.
[7] LI J J,YANG G,ZHANG Q H,et al. Function of *Akkermansia muciniphila* in type 2 diabetes and related diseases[J]. Front Microbiol,2023,14:1172400.
[8] HASANI A,EBRAHIMZADEH S,HEMMATI F,et al. The role of *Akkermansia muciniphila* in obesity,diabetes and atherosclerosis[J]. J Med Microbiol,2021,70(10):712－715.
[9] ZAFAR H,SAIER MH J R. Gut *Bacteroides* species in health and disease[J]. Gut Microbes,2021,13(1):1－20.
[10] ZHU Y Q,CHEN B R,ZHANG X Y,et al. Exploration of the *Muribaculaceae* family in the gut microbiota: diversity,metabolism,and function[J]. Nutrients,2024,16(16):2660.
[11] MUKHERJEE A,LORDAN C,ROSS R P,et al. Gut microbes from the phylogenetically diverse genus *Eubacterium* and their various contributions to gut health[J]. Gut Microbes,2020,12(1):1802866.
[12] PARKER B J,WEARSCH P A,VELOO A C M,et al. The genus *Alistipes*: gut bacteria with emerging implications to inflammation,cancer,and mental health[J]. Front Immunol,2020,11:906.
[13] FENG Z,LONG W M,HAO B H,et al. A human stool－derived *Bilophila wadsworthia* strain caused systemic inflammation in specific－pathogen－free mice[J]. Gut Pathog,2017,9:59.
[14] 张愿,张翕宇,谢春光. 基于肠道菌群及肠黏膜屏障探讨参芪复方对糖尿病 GK 大鼠血糖波动的影响[J]. 辽宁中医杂志,2024,51(5):197－200,后插 5.
[15] BALDELLI V,SCALDAFERRI F,PUTIGNANI L,et al. The role of Enterobacteriaceae in gut microbiota dysbiosis in inflammatory bowel diseases[J]. Microorganisms,2021,9(4):697.
[16] TAGLIALEGNA A. Fat,desulfovibrio and cancer[J]. Nat Rev Microbiol,2024,22(7):388.
[17] MURROS K E. Hydrogen sulfide produced by gut bacteria may induce Parkinson's disease[J]. Cells,2022,11(6):978.
[18] HUANG S B,CHEN J Z,CUI Z J,et al. *Lachnospiraceae*－derived butyrate mediates protection of high fermentable fiber against placental inflammation in gestational diabetes mellitus[J]. Sci Adv,2023,9(44):7337.
[19] 黄焕荣,李朋举,江小柯,等. 活泼瘤胃球菌在炎症性肠病发病中的作用[J]. 中国临床研究,2024,37(10):1608－1612.
[20] NIE K,MA K J,LUO W W,et al. *Roseburia intestinalis*: a beneficial gut organism from the discoveries in genus and species[J]. Front Cell Infect Microbiol,2021,11:757718.
[21] YAO Y,CAI X Y,FEI W D,et al. The role of short－chain fatty acids in immunity,inflammation and metabolism[J]. Crit Rev Food Sci Nutr,2022,62(1):1－12.
[22] REKHA K,VENKIDASAMY B,SAMYNATHAN R,et al. Short－chain fatty acid: an updated review on signaling,metabolism,and therapeutic effects[J]. Crit Rev Food Sci Nutr,2024,64(9):2461－2489.
[23] LA ROSA S L,LETH M L,MICHALAK L,et al. The human gut Firmicute *Roseburia intestinalis* is a primary degrader of dietary β－mannans[J]. Nat Commun,2019,10(1):905.
[24] CANFORA E E,JOCKEN J W,BLAAK E E. Short－chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity[J]. Nat Rev Endocrinol,2015,11(10):577－591.
[25] 王永安,张春雷,王艳红,等. 短链脂肪酸受体 GPR41、GPR43 的信号通路及生理功能[J]. 中国牛业科学,2013(6):49－53.
[26] ZHAO X,WANG M H,WEN Z T,et al. GLP－1 receptor agonists: beyond their pancreatic effects[J]. Front Endocrinol,2021,12:721135.
[27] YUN H,SUN L,WU Q Q,et al. Associations among circulating sphingolipids,β－cell function,and risk of developing type 2 diabetes: a population－based cohort study in China[J]. PLoS Med,2020,17(12):e1003451.
[28] HU Y,DAI K Z. Sphingosine 1－phosphate metabolism and signaling[J]. Adv Exp Med Biol,2022,1372:67－76.
[29] PYNE N J,MCNAUGHTON M,BOOMKAMP S,et al. Role of sphingosine 1－phosphate receptors,sphingosine kinases and sphingosine in cancer and inflammation[J]. Adv Biol Regul,2016,60:151－159.

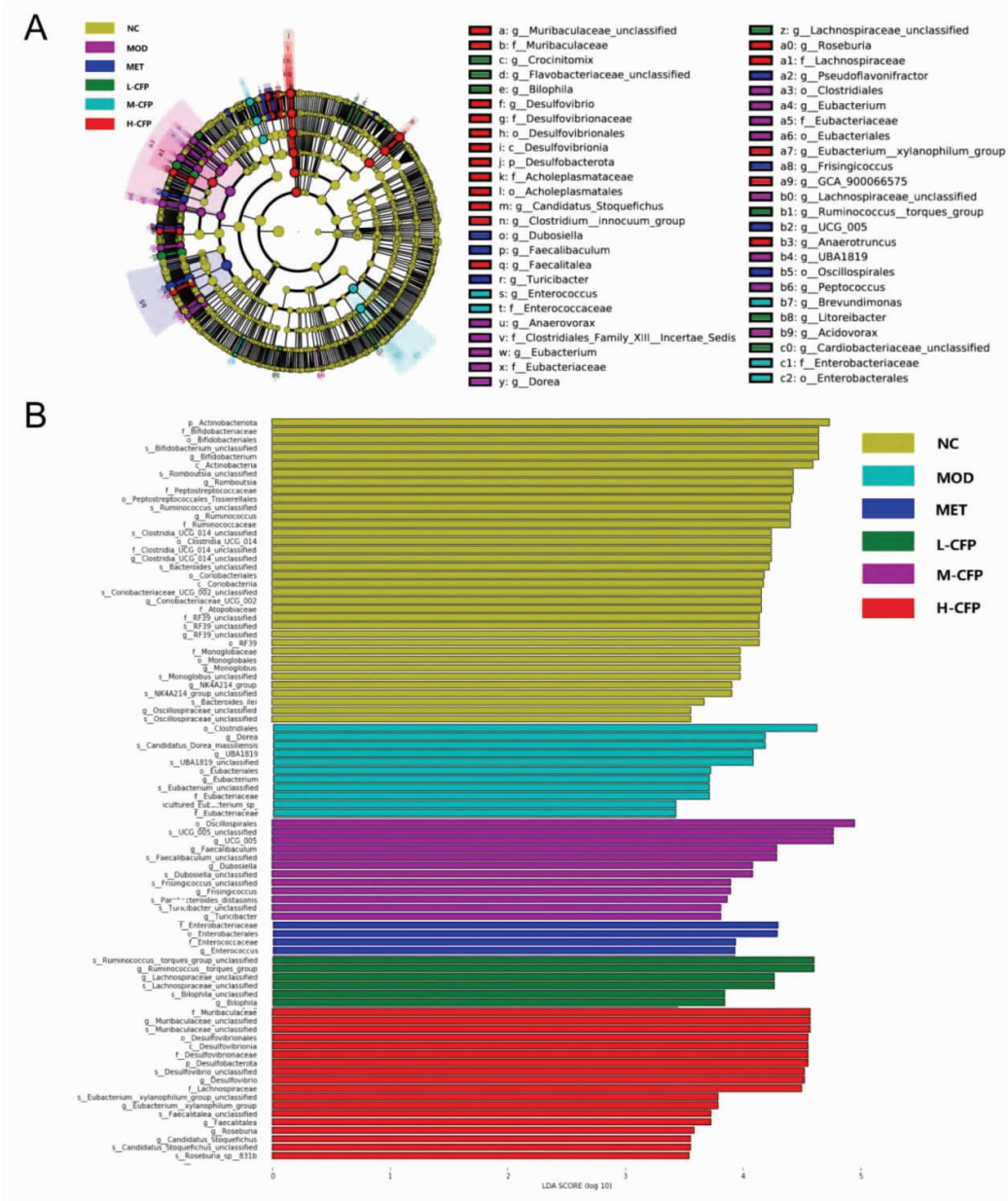
整合肠道菌群和代谢组学探究山茱萸多糖干预 2 型糖尿病的作用机制

（正文见 19－24 页）



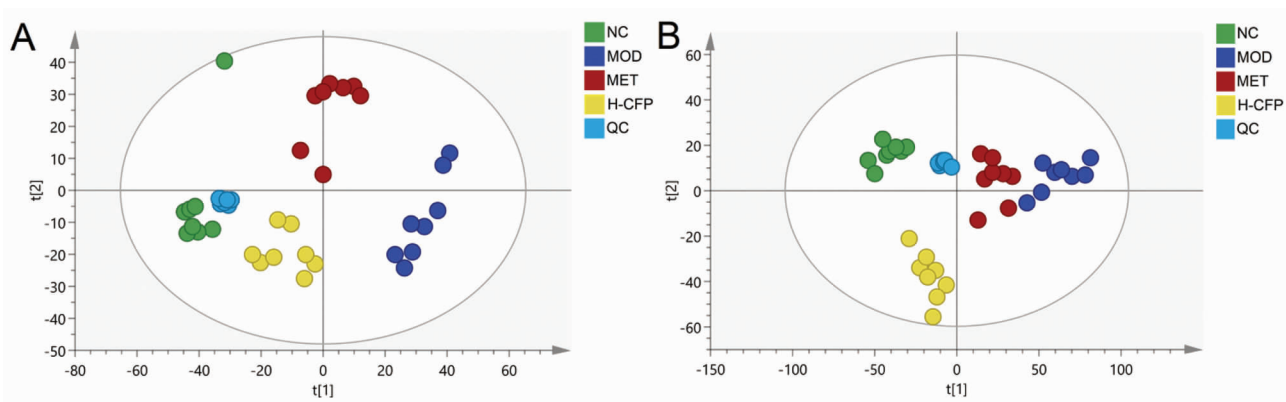
注：A. 稀释曲线；B. 丰度等级曲线；C. 主坐标分析（PCoA）；D. 相似性分析（ANOSIM）；E. 门水平菌群柱状图；F. 门水平菌群热图；G. 属水平菌群柱状图；H. 属水平菌群热图。

图 1　α 多样性、β 多样性及物种差异



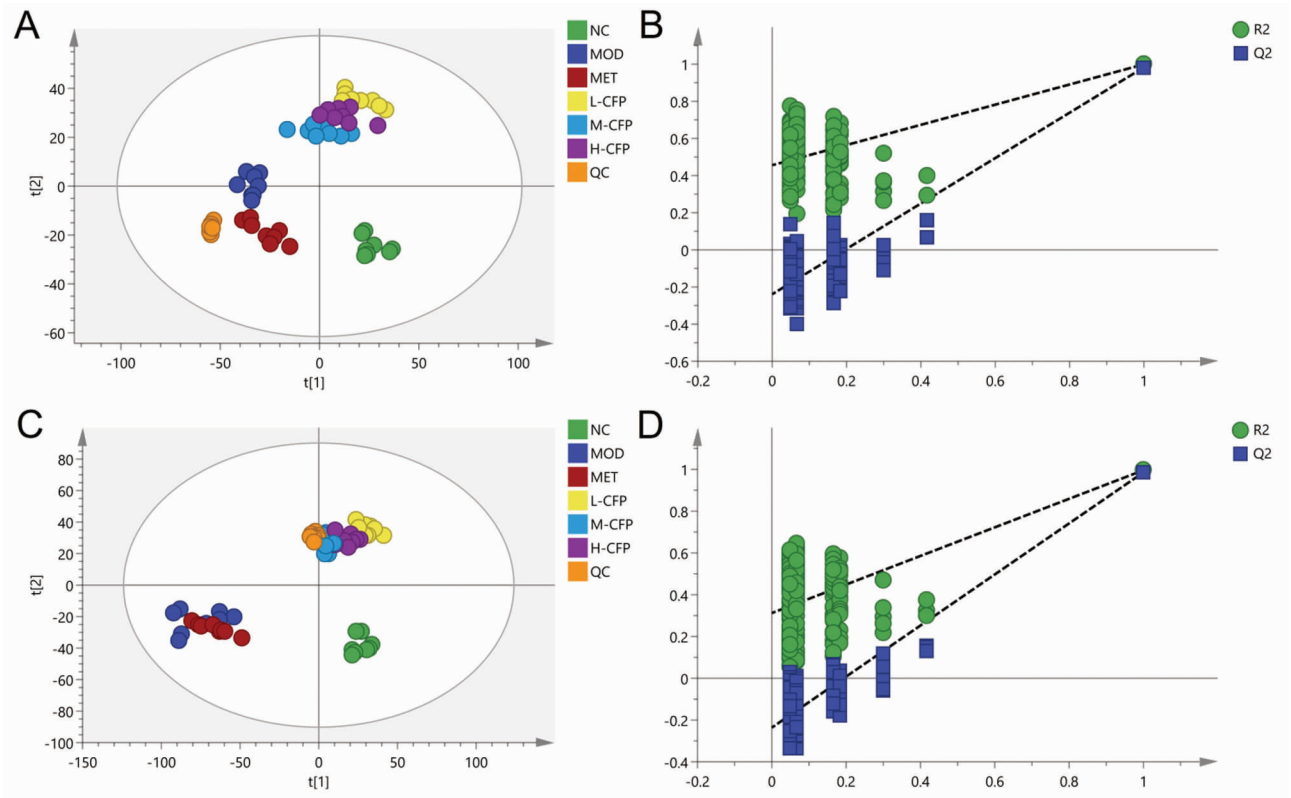
注：A. LEfSe 图；B. 进化分支图。

图 2　差异物种分析



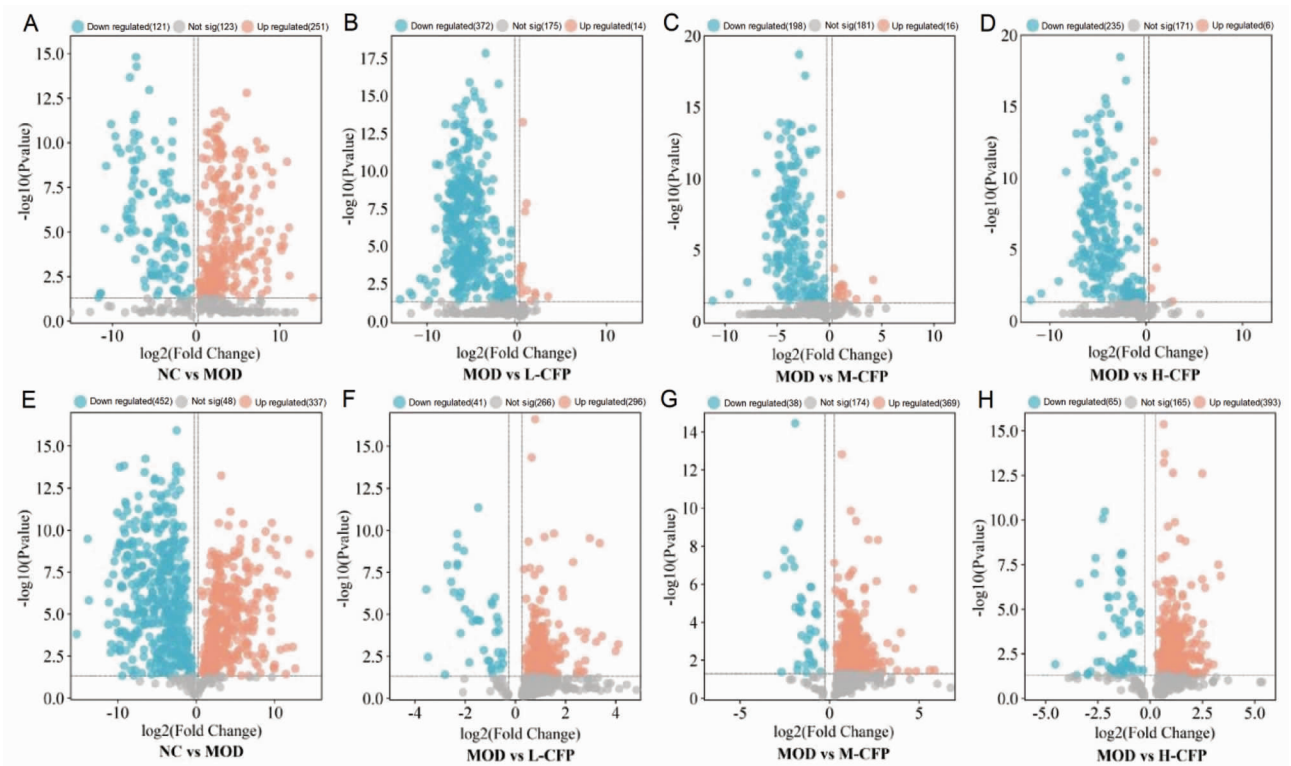
注：A. 正离子模式；B. 负离子模式。

图 5　大鼠粪便样品 PCA 得分图



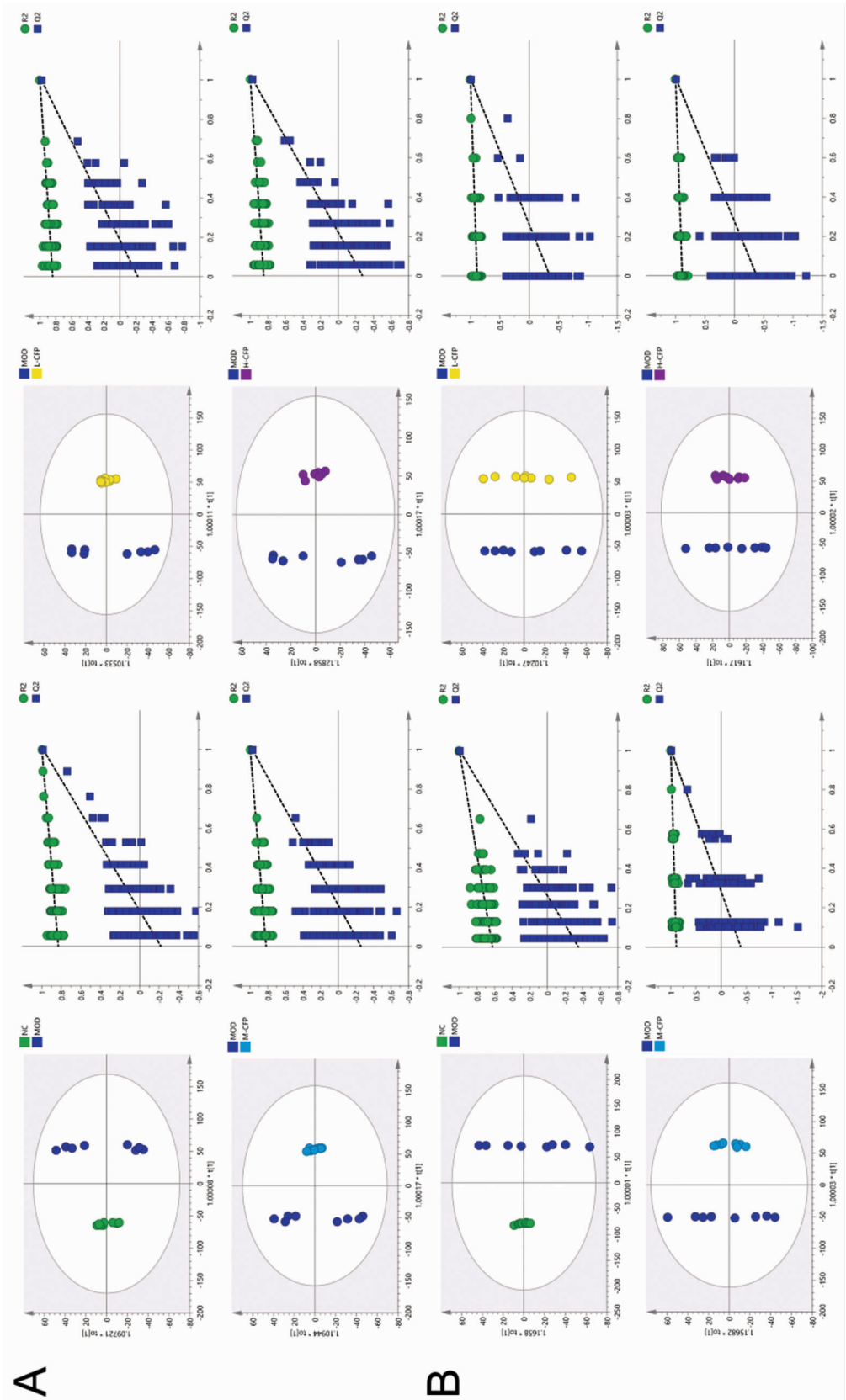
注：A、B. 正离子模式；C、D. 负离子模式。

图 6　大鼠粪便样品 PLS－DA 得分图及 200 次置换检验图



注：A、B、C、D. 正离子模式；E、F、G、H. 负离子模式。

图 8　不同组别大鼠粪便差异代谢物火山图



注：A. 正离子模式；B. 负离子模式。

图 7　大鼠粪便样品 OPLS－DA 得分图及 200 次置换检验图

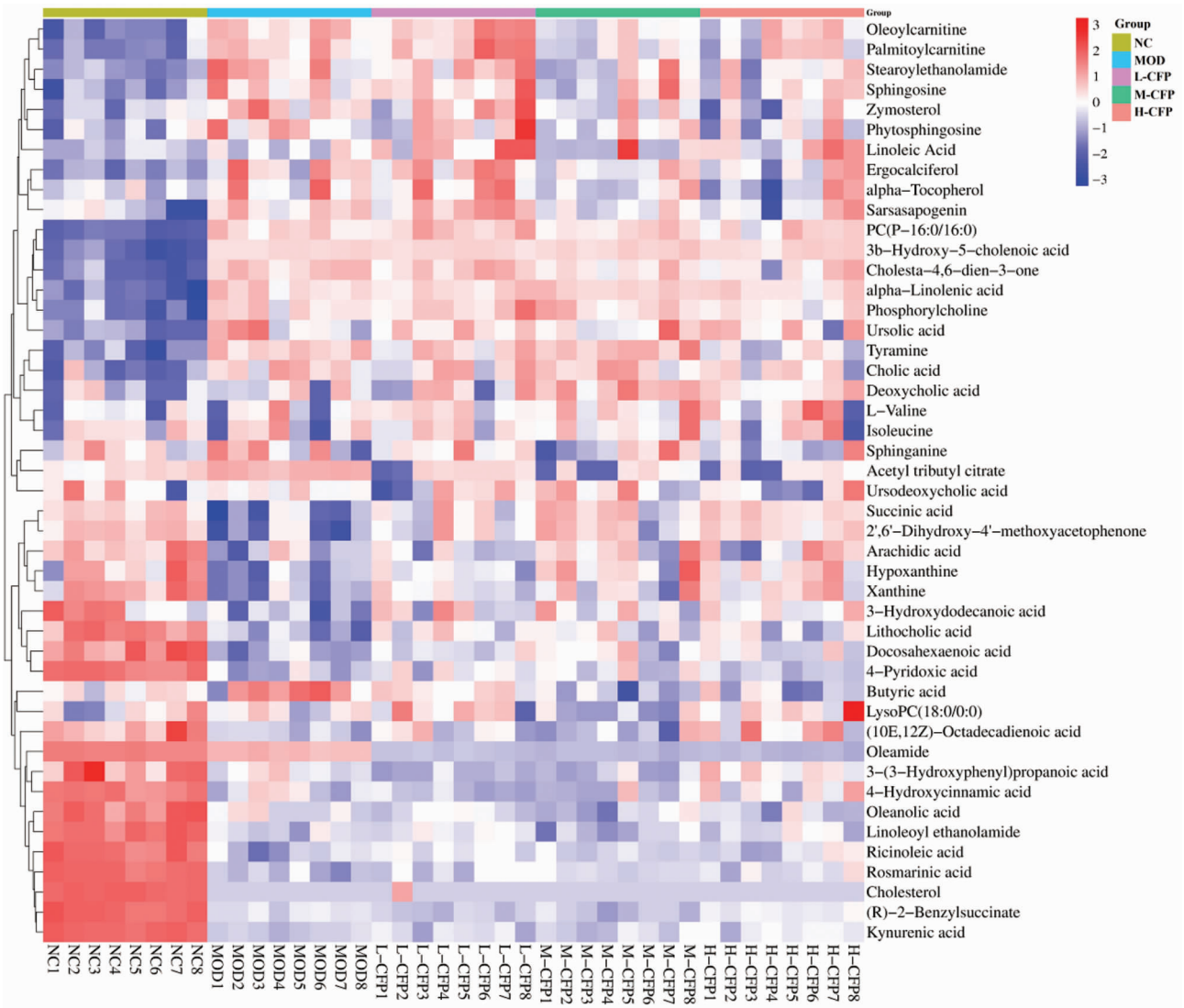
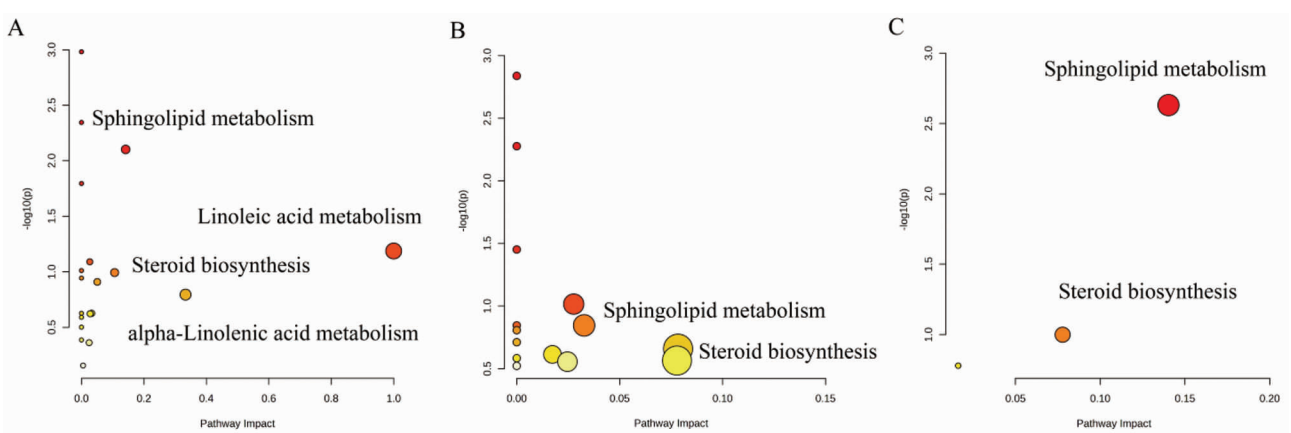
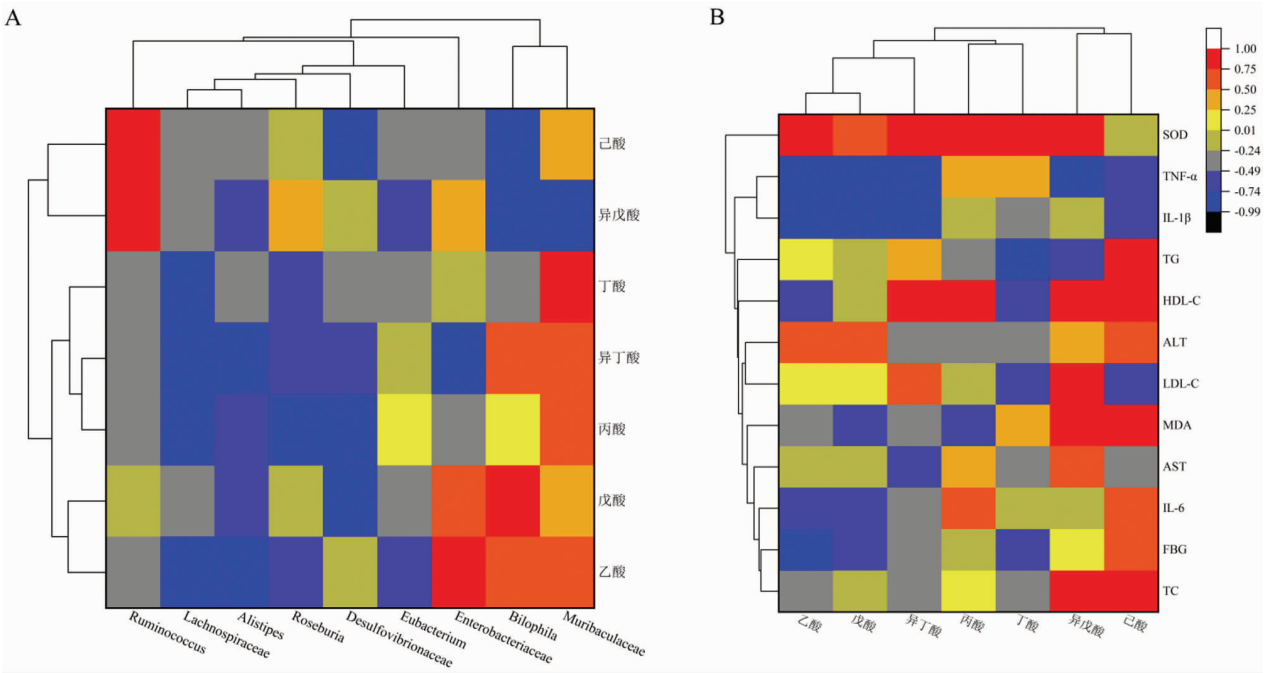


图 9　各组大鼠粪便差异代谢物聚类分析热图



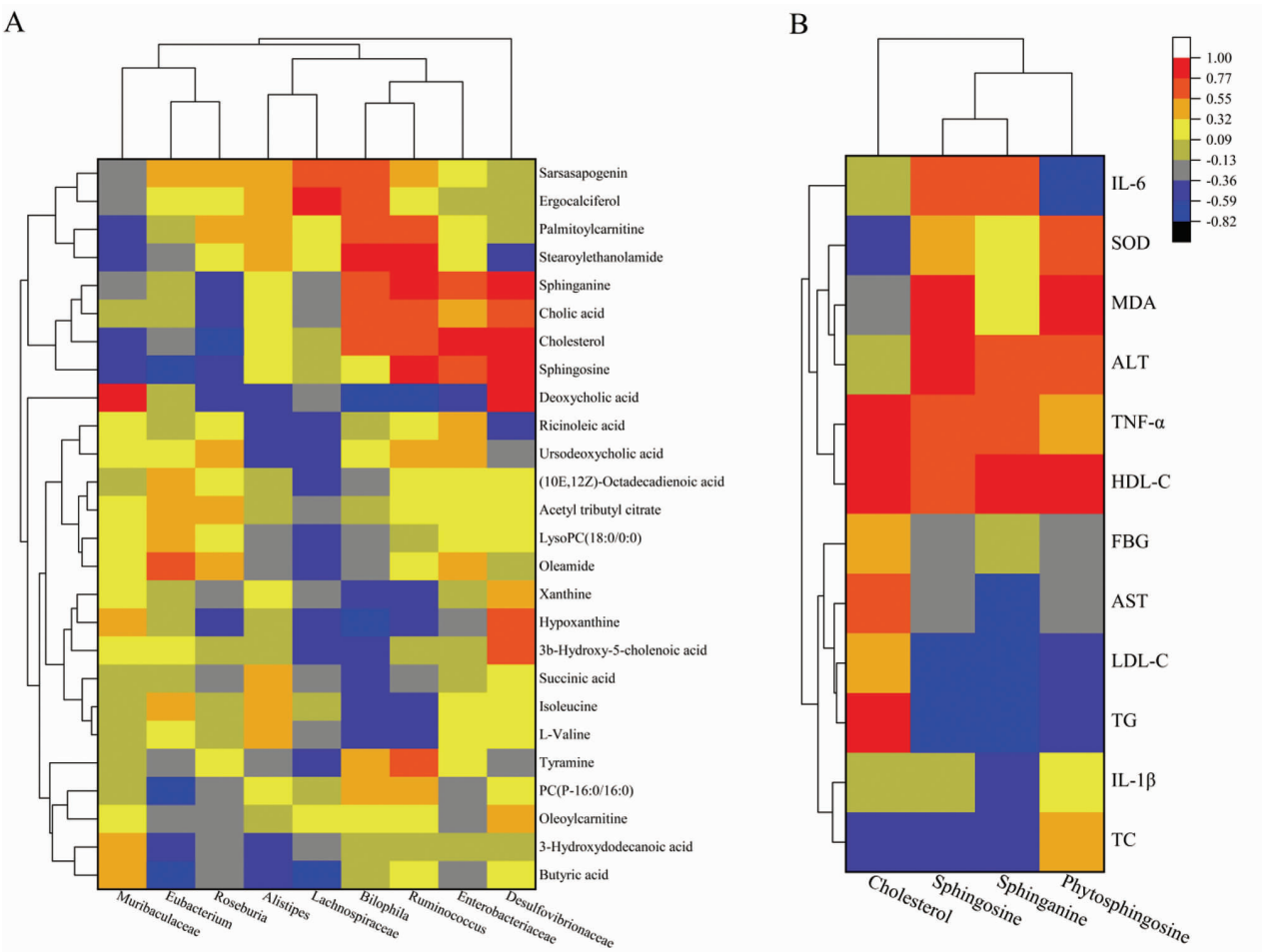
注：A. 与 2 型糖尿病相关通路；B. 山茱萸多糖干预通路；C. 肠道菌群干预通路。

图 10　粪便代谢通路分析结果



注：A. 肠道菌群与 SCFAs 联合分析；B. SCFAs 与药效指标联合分析。

图 11　SCFAs 联合分析



注：A. 肠道菌群与差异代谢物联合分析；B. 差异代谢物与药效指标联合分析。

图 12　差异代谢物联合分析