

· 中药药理 ·

黄连肉桂对 db/db 小鼠肠道菌群、炎症因子及短链脂肪酸的影响*

穆国华¹ 赵宗江² 周婧雅¹ 赵进喜^{1#}

(1 北京中医药大学东直门医院 北京 100700; 2 北京中医药大学中医学院)

摘要:目的 研究黄连肉桂对 db/db 小鼠的降糖作用,探讨其对 db/db 小鼠肠道菌群、炎症因子及短链脂肪酸(SCFAs)的影响机制。**方法** 以6只 db/m 小鼠为空白组,30只 db/db 小鼠随机分成5组,模型组给予等量的生理盐水,其他4组分别用二甲双胍(0.23 g/kg)、黄连(18.20 g/kg)、肉桂(1.82 g/kg)及黄连肉桂进行干预。0、8周测量各组小鼠的体重,在0、4、8周分别测量各组小鼠的血糖,第8周时采集各组小鼠粪便,利用 Illumina Miseq 平台测序,进行门群菌落物种分析、多样性分析;气相色谱法检测粪便中乙酸、丙酸、正丁酸含量;利用 Western blot 方法检测小鼠肝脏肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)表达。**结果** 黄连肉桂组小鼠体重增长趋势减缓,高血糖状态改善,与模型组相比差异有统计学意义($P < 0.05$);与空白组相比,模型组及二甲双胍组小鼠厚壁菌门(Firmicutes)丰度增加,拟杆菌门(Bacteroides)丰度下降。与模型组及二甲双胍组相比,中药3组的厚壁菌门(Firmicutes)丰度下降,黄连、肉桂组拟杆菌门(Bacteroides)丰度增加;肉桂组、黄连肉桂组放线菌门(Actinobacteria)的丰度增加。空白组与模型组之间物种菌群组成丰度差异明显,二甲双胍组与模型组物种组成丰度相似,黄连组、肉桂组与空白组丰度接近,黄连肉桂组与其余组物种组成丰度均存在差异;abundance 曲线示中药3组小鼠肠道菌群丰度及均匀度较其他各组降低,提示黄连肉桂可能通过抑制某些菌落的生长,从而使得肠道内形成新的菌群结构。模型组小鼠肝脏 TNF- α 含量较空白组明显增多($P < 0.05$)。黄连肉桂组 TNF- α 含量较模型组明显降低($P < 0.05$);与空白组比较,模型组小鼠肝脏 IL-6 含量明显增多($P < 0.05$),黄连组、肉桂组、黄连肉桂组 IL-6 较模型组明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。黄连肉桂组提高 SCFAs 中乙酸、丙酸、丁酸的含量,与模型组比差异有统计学意义($P < 0.05$),各干预组中黄连肉桂组更具优势,其均值高于其他干预组。**结论** 黄连肉桂可能通过调节 db/db 小鼠肠道菌群、改善小鼠炎症反应及增加 SCFAs 含量达到对2型糖尿病的防治作用。

关键词:黄连;肉桂;2型糖尿病;肠道菌群;炎症因子;短链脂肪酸;小鼠

doi: 10.3969/j.issn.1006-2157.2021.02.008

中图分类号:R285.5

Effects of *Rhizoma Coptidis* and *Cortex Cinnamomi* on the intestinal flora, inflammatory factors and short-chain fatty acids in db/db mice*Mu Guohua¹, Zhao Zongjiang², Zhou Jingya¹, Zhao Jinxi^{1#}

(1 Dong Zhimen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China; 2 School of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract: Objective To study the hypoglycemic effect of *Huanglian* (coptis, *Rhizoma Coptidis*) and *Rougui* (cinnamon bark, *Cortex Cinnamomi*) on db/db mice, and to explore the mechanism of its effect on the intestinal flora, inflammatory factors and short-chain fatty acids (SCFAs) in db/db mice.

Methods Six db/m mice were included in the blank group, and 30 db/db mice were randomly divided

穆国华,男,在读博士生

通信作者:赵进喜,博士,教授,主任医师,博士生导师,主要研究方向:中医药对肾病内分泌疾病防治, E-mail: zhaojinximd@126.com

* 国家自然科学基金项目(No. 8177151329)

into the model group, metformin group, coptis group, cinnamon bark group and coptis and cinnamon bark group ($n = 6$). In the four treatment groups, metformin (0.23g/kg), coptis (18.2g/kg), cinnamon bark (1.82g/kg) and coptis and cinnamon bark were gavaged with the corresponding drugs respectively, and the control group was gavaged with the same amount of normal saline solution. The body weight of each group of mice was measured at week 0 and 8, and the blood glucose was measured at week 0, 4, and 8. The feces of each group of mice were taken at the 8th week for analysis of phylum flora species and species diversity analysis with Illumina MiSeq benchtop sequencer. The content of acetic acid, propionic acid, and n-butyric acid in feces were detected by gas chromatography. The expression of TNF- α and IL-6 in the liver of mice was detected by Western blot. **Results** The weight gain trend of the mice slowed down and the hyperglycemia state improved in the coptis and cinnamon group, compared with the model group ($P < 0.01$). The abundance of Firmicutes was increased, while that of the Bacteroidetes was decreased in the control group and three treatment groups with Chinese medicinals, compared with the blank group. The abundance of Firmicutes was decreased in the three treatment groups with Chinese medicinals, while the abundance of the Bacteroidetes was increased in the coptis group and cinnamon bark group, compared with the control group and metformin group. Regarding species diversity, there was significant difference between the blank group and control group, similarity between the control group and metformin group, similarity among the coptis group, cinnamon bark group, and blank group, while differences between the coptis and cinnamon bark group and any other group. The abundance curve showed that the abundance and uniformity of the intestinal flora of the three treatment groups were lower than those of the other groups. The content of TNF α in the liver of mice in the control group was significantly higher than that in the blank group ($P < 0.05$), but it was significantly lower in the coptis and cinnamon bark group than that of the control group ($P < 0.05$). The content of IL-6 in the liver of mice in the control group was significantly increased compared with the blank group ($P < 0.05$), but it was significantly lower in all the three treatment groups with Chinese medicinals compared with that of the control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The contents of acetic acid, propionic acid and butyric acid in SCFAs were significantly increased in the coptis and cinnamon bark group, compared with the control group ($P < 0.05$). The coptis and cinnamon bark group showed a higher mean score compared with the other three treatment groups. **Conclusion** Huanglian (coptis, *Rhizoma Coptidis*) and Rougui (cinnamon bark, *Cortex Cinnamomi*) may help in the prevention and treatment of type 2 diabetes by regulating the intestinal flora, improving the inflammatory response, and increasing the content of SCFAs.

Keywords: Huanglian (coptis, *Rhizoma Coptidis*); Rougui (cinnamon bark, *Cortex Cinnamomi*); type 2 diabetes; intestinal flora; inflammatory factors; short-chain fatty acids; rats

Corresponding author: Prof. Zhao Jinxi, Ph. D., Doctoral Supervisor. Department of Nephrology, Dongzhimen Hospital, No. 5, Haiyuncang Street, Dongcheng District, Beijing 100700. E-mail: zhaojinximd@126.com

Funding: National Natural Science Foundation of China (No. 8177151329)

Ethical review: Committee of Ethical Review on Experimental Animals in China Academy of Chinese Medical Sciences (No. 20190710)

Conflicts of interest: None

2型糖尿病(T2DM)是以高血糖状态、胰岛 β 细胞功能受损、胰岛素分泌不足以及胰岛素抵抗为主要特征的一种疾病。近几年来,T2DM的发病率不

断攀升,且逐渐呈现年轻化趋势。2010年中国疾病预防控制中心(CDC)联合中华医学会内分泌学会对我国18岁及以上人群糖尿病的患病情况进行

了调查,结果显示糖尿病患病率高达 9.7%,而到 2013 年时,我国慢性病及其危险因素监测显示,18 岁及以上人群糖尿病患病率已上升到 10.4%^[1]。近几年的研究发现,肠道菌群的紊乱是 T2DM 发生发展的一个重要影响因素,调节肠道菌群可以有效地调控血糖^[2-3]。短链脂肪酸(SCFAs)主要包含乙酸、丙酸、丁酸等,是肠道菌群发酵膳食纤维的产物,研究显示,SCFAs 能够参与并影响人体的能量稳态和葡萄糖代谢^[4]。肠道菌群紊乱,可以导致机体免疫能力下降,引起慢性炎症反应,机体炎症反应信号通路被激活,影响胰岛素分泌,引起胰岛素抵抗,进而诱发 T2DM 的发生^[5-6]。

2 型糖尿病属于中医“消渴病”的范畴,《类经》:“消渴证,不交而火偏盛也。”黄连、肉桂组成的交泰丸是治疗心肾不交的著名中药方剂。实验研究表明,黄连、肉桂可以有效地改善糖尿病的高血糖状态,改善胰岛细胞功能,延缓糖尿病并发症发病进程^[7-9]。目前尚少有黄连、肉桂通过调节肠道菌群、炎症因子及短链脂肪酸降糖的机制研究,本研究以 db/db 小鼠为研究对象,通过对小鼠体重、血糖、肠道菌群、炎症因子及短链脂肪酸的检测,探讨黄连、肉桂的降低血糖的机制,为更好地应用黄连、肉桂治疗 T2DM 提供实验数据支持。

1 材料

1.1 动物

6 周龄 SPF 级雄性自发性 2 型糖尿病 db/db 小鼠(C57BLKS) 30 只以及 6 只同周龄雄性同窝野生型 db/m 小鼠(购自常州卡文思实验动物有限公司,合格证号:SCXK(苏)2016-0010,db/m 小鼠 20~25 g, db/db 小鼠体重 35~40 g,于中国中医科学院中医基础理论研究所 SPF 级动物房饲养,室温(22±2)℃,湿度 50%±10%,每天光照 12 h,自由饮水,自由进食(标准饲料)。

1.2 伦理审查

本实验研究经中国中医科学院中医基础理论研究所动物实验伦理委员会审查批准,编号:20190710。

1.3 药物及试剂

二甲双胍片,规格 0.5 g×20 片,商品名:格华止,购自中美上海施贵宝制药有限公司,批号:H20023370。黄连、肉桂为中药配方浸膏:黄连及肉桂购自北京康美制药有限公司,由北京中医药大学科研实验中心进行含量测定,并制成浸膏,均符合 2010 版药典合格标准。 β -actin(ProteinTech,66009-

1-Ig); IL-6 (ProteinTech,66146-1-Ig); TNF- α (ProteinTech,17590-1-AP); eECL Western Blot Kit 高灵敏度化学发光检测试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司,CW0049); PVDF 膜购自 MILLIPORE 公司;脱脂奶粉(OXOID,lp0031); Tris 碱(Amresco,0497-500G); 甘氨酸(Amresco, M103-1KG); 十二烷基硫酸钠(Amresco, M107-250G); 丙烯酰胺(Amresco, M104-50G); N,N'-亚甲叉丙烯酰胺(Amresco, M8200N); 过硫酸铵(Amresco,0486-100G); 四甲基乙二胺(Sigma, T9281-25ML); 溴酚蓝(Amresco, 0449-100G); 甲醇(分析纯,北京化工厂); 盐酸(分析纯,北京化工厂)。

1.4 仪器

稳豪型血糖试纸,产品标准证号:YZB/USA 0659-2010,强生(上海)医疗器械有限公司。1.8 mL 外旋冻存管,50 mL 离心管,购自 Corning 公司。磁珠法土壤和粪便基因组 DNA 提取试剂盒(DP712),购自天根公司;强生稳豪型血糖仪(OneTouch Ultra-Easy),强生(上海)医疗器械有限公司;体重仪;台式高速冷冻离心机:安徽中科中佳,型号 KDC-140HR; DNA 抽提试剂盒 DNeasy[®] PowerSoil[®] Pro Kit QIAGEN 美国;测序试剂盒 MiSeq Reagent Kit v3/ NovaSeq Reagent Kits Illumina; 8890B-5977B GC/MSD 气质联用仪,安捷伦公司(Agilent Technologies Inc. CA, UAS); DYY-6C 型电泳仪, BIO-RAD Mini-TRANS-BLOT CELL, DYCZ-24DN 型迷你双垂直电泳槽; TS-1 脱色摇床(太仓市实验设备厂); 生物分子成像仪(日本富士 LAS-4000 MINI)。

2 方法

2.1 分组

普通饲料适应性喂养 1 周后,禁食 6 h,间隔 1 d 测量 db/db 糖尿病小鼠尾尖静脉血糖,测定 3 次,选取血糖平均值 > 13 mmol/L 的 db/db 小鼠^[10] 30 只,随机分为 5 组:模型组、二甲双胍组、肉桂组、黄连组、黄连肉桂组,每组 6 只,以同龄的 db/m 小鼠 6 只为空白组。

2.2 给药

黄连:肉桂 = 10:1,人和动物间剂量的换算方法参考徐叔云教授主编的《药理实验方法学》^[11],按体表面积进行换算:小鼠剂量(mg/kg) = 9.1 × 人的临床剂量(mg/kg)。各组灌胃给药,空白组及模型组给予等量纯净水,二甲双胍组(0.23 g/kg)、黄连组(18.2 g/kg)、肉桂组(1.82 g/kg)、黄连肉桂组给予相应药物。药物干预时间为 8 周。

2.3 体重、血糖检测

在药物干预期间的0、4、8周时,禁食6 h后直接采用血糖仪测定尾静脉血血糖;每周测量小鼠体重。

2.4 肠道菌群检测分析

第8周时,采用提尾反射法收集小鼠粪便标本,使用无菌EP管收集标本,每管采集3粒粪便,标记后放入-80℃低温冰箱保存,利用Illumina公司的Miseq PE300平台进行测序,观察各组小鼠肠道菌群分布情况。

通过样本层级聚类分析、主成分(PCA)分析、主坐标(PCoA)分析进行组间Beta多样性分析,对不同组别的微生物群落间的物种多样性进行组间比较。选择Bray-Curtis距离算法对样本间菌群的丰度分布差异程度进行量化分析,获得距离矩阵,制作样本距离热图。Rank-Abundance曲线常用来解释多样性的两个方面,即物种的丰度与物种的均匀度。曲线在水平方向的宽度代表物种的丰度,其丰度越高,曲线在横轴上的范围便越大。曲线的形状代表了样品中物种的均匀度,曲线越趋于平坦提示物种分布越均匀。本研究Rank-Abundance曲线采用R(version 3.1.1)软件制图。

2.5 Western Blot 法检测

严格按照试剂盒说明书操作,检测小鼠肝脏炎性因子的表达。

2.6 气相色谱法检测

检测粪便中乙酸、丙酸、丁酸及异丁酸含量,采用默认参数对各离子碎片进行自动识别和积分,并辅助人工检查,以分析物的质谱峰面积为纵坐标,以分析物的浓度为横坐标,绘制线性回归标准曲线,将样品分析物的质谱峰面积,代入线性方程中,计算浓度结果。

2.7 统计方法

数据采用SPSS 24.0进行统计分析,经检验所有数据均符合正态分布、方差齐,计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA),具有显著性后,采用LSD法进行多重比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠一般观察和体重测定

db/m组小鼠毛色光亮,行动敏捷,体型瘦长,活动频繁。db/db组小鼠形体肥胖,动作迟缓,活动少,摄食及饮水增多,灌胃后期模型组出现竖毛,体温偏低,对外界刺激反应迟钝的现象。比较各组小鼠体重的变化情况,空白组与其他组相比体重明显减轻(P

< 0.05),黄连组、肉桂组、黄连肉桂组与二甲双胍组相比体重明显减轻($P < 0.05$),黄连肉桂组与模型组相比体重明显减轻($P < 0.05$)。结果见表1。

表1 各组小鼠体重比较($g; \bar{x} \pm s; n=6$)

Table 1 Changes of body weight in mice of each group

组别 Groups	剂量 Dose (g/kg)	0周 (0 week)	8周 (8 week)
空白组 Blank group		24.03 ± 1.04	29.23 ± 2.30
模型组 Model group		40.47 ± 1.21 *	48.82 ± 3.39 *
二甲双胍组 Metformin group	0.23	40.95 ± 2.13 *	51.77 ± 4.01 *
黄连组 Coptis group	18.20	40.32 ± 1.48 *	45.80 ± 1.72 * [△]
肉桂组 Cinnamon	1.82	40.37 ± 1.06 *	46.88 ± 3.77 * [△]
黄连肉桂组 Coptis & cinnamon bark group	18.20 + 1.82	40.95 ± 0.81 *	43.53 ± 3.91 * ^{#△}
<i>F</i>		149.279	34.447
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:与空白组相比* $P < 0.05$;与模型组相比# $P < 0.05$;与二甲双胍组相比 $\Delta P < 0.05$ 。

Note: * $P < 0.05$ compared with the blank group; # $P < 0.05$ compared with the model group; $\Delta P < 0.05$ compared with the metformin group.

3.2 对小鼠血糖影响

药物干预前,db/db小鼠各组的血糖无统计学差异($P > 0.05$),干预后,空白组、模型组小鼠血糖相对平稳,各治疗组小鼠血糖呈明显下降趋势,其中黄连肉桂组小鼠血糖下降趋势最为明显。8周时模型组小鼠血糖明显高于其他组($P < 0.05$),黄连组与黄连肉桂组明显优于二甲双胍组($P < 0.05$),黄连组、黄连肉桂组低于肉桂组($P < 0.05$),差异有统计学意义。结果见表2。

3.3 肠道菌群组成分析

3.3.1 生物门级群落分析

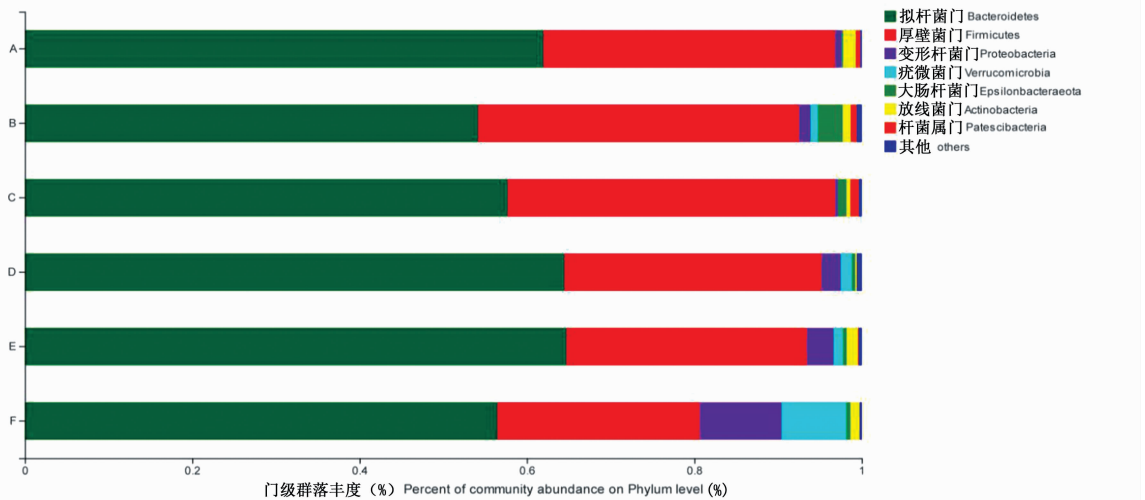
在门(Phylum)分类水平下进行物种分析,与空白组相比,模型组及二甲双胍组小鼠厚壁菌门丰度增加,拟杆菌门(Bacteroidetes)丰度下降。与模型组及二甲双胍组相比,中药3组的厚壁菌门(Firmicutes)丰度明显下降,其中黄连肉桂组下降最明显;黄连组、肉桂组较杆菌门丰度增加;肉桂组及黄连肉桂组放线菌门(Actinobacteria)的丰度增加;中药3组变形杆菌门(Proteobacteria)及疣微菌门(Verrucomicrobia)丰度增加。结果见图1。

表2 各组小鼠血糖比较 (mmol/L; $\bar{x} \pm s$; $n=6$)Table 2 Comparison of blood glucose value in mice of each group (mmol/L; $\bar{x} \pm s$; $n=6$)

组别 Group	剂量 Dose(g/kg)	0周(0 week)	4周(4 week)	8周(8 week)
空白组 Blank group		6.72 ± 1.05	7.38 ± 0.64	7.13 ± 0.87
模型组 Model group		27.27 ± 3.35 ^{△△}	28.72 ± 3.00 ^{△△}	28.70 ± 3.02 ^{△△}
二甲双胍组 Metformin group	0.23	24.92 ± 4.81 ^{△△}	18.93 ± 5.79 ^{△△}	24.15 ± 2.61 ^{△△*}
黄连组 Coptis group	18.20	26.40 ± 4.41 ^{△△}	22.07 ± 4.63 ^{△△}	19.50 ± 4.91 ^{△△*#▲}
肉桂组 Cinnamon bark group	1.82	23.42 ± 2.97 ^{△△}	28.33 ± 2.00 ^{△△}	24.40 ± 1.96 ^{△△*}
黄连肉桂组 Coptis & cinnamon bark group	18.20 + 1.82	26.58 ± 1.91 ^{△△}	24.63 ± 5.05 ^{△△}	17.55 ± 4.38 ^{△△*#▲}
<i>F</i>		34.325	24.123	32.918
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白组比较^{△△} $P < 0.01$;与模型组比较^{*} $P < 0.05$;与二甲双胍组比较[#] $P < 0.05$;与肉桂组比较[▲] $P < 0.05$ 。

Note: ^{△△} $P < 0.01$ compared with the blank group; ^{*} $P < 0.05$ compared with the model group; [#] $P < 0.05$ compared with the metformin group; [▲] $P < 0.05$ compared with the cinnamon bark group.



A: 空白组; B: 模型组; C: 二甲双胍组; D: 黄连组; E: 肉桂组; F: 黄连肉桂组。

A: Blank group; B: Model group; C: Metformin group; D: Coptis group; E: Cinnamon bark group; F: Coptis and cinnamon bark group.

图1 菌群物种组成分类图

Fig. 1 Classification of bacterial species composition

3.3.2 Beta 多样性相关性分析

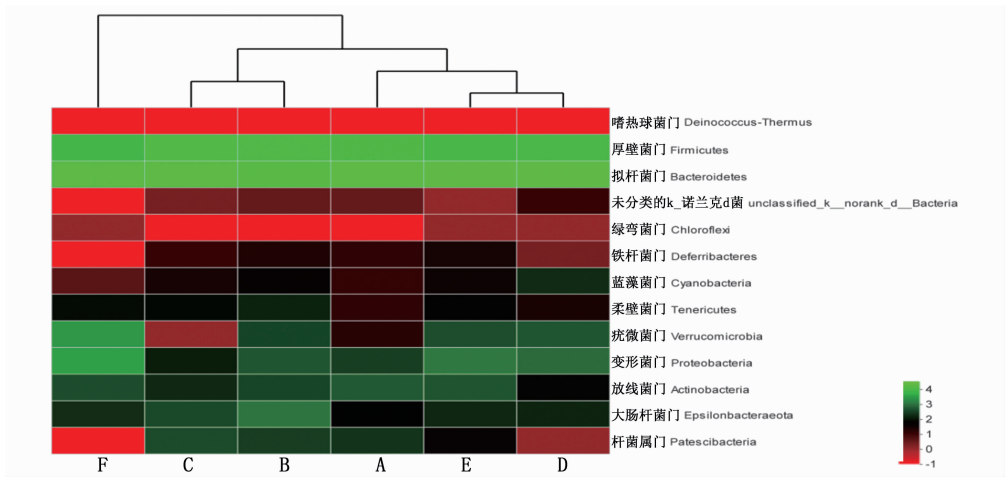
空白组与模型组之间物种组成丰度差异明显,二甲双胍组与模型组物种组成丰度相似,黄连组、肉桂组间枝长最短,物种组成丰度相似,其次是与空白组丰度相似,黄连肉桂组与其余组物种组成丰度差异较大。结果见图2。

空白组与模型组之间物种菌群组成丰度差异明显,二甲双胍组与模型组物种组成丰度相似,黄连组、肉桂组与空白组丰度接近,黄连肉桂组与其余组物种组成丰度均存在差异。中药3组的 Rank-Abundance 曲线较为陡峭,表明其肠道内菌群物种的丰度及均匀度降低,提示中药组改变了 db/db 小鼠肠道菌群的多样性。而模型组样品曲线整体上较其

他组更为平缓,倾斜度较低,表明其肠道菌群的多样性较高。此结果提示黄连肉桂改变了 db/db 小鼠肠道菌群结构,可能通过抑制某些菌落的生长,从而使得肠道内形成新的稳定菌群结构。具体结果见图3。

3.4 黄连肉桂对 db/db 小鼠肝脏炎症因子影响

与空白组比较,模型组小鼠肝脏 TNF- α 含量明显增多($P < 0.05$);黄连肉桂组 TNF- α 含量较模型组明显降低($P < 0.05$),余各组间差异无统计学意义。与空白组比较,模型组小鼠肝脏 IL-6 含量明显增多($P < 0.05$);黄连组、肉桂组、黄连肉桂组 IL-6 较模型组明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),余各组间差异无统计学意义。结果见图4,表3。

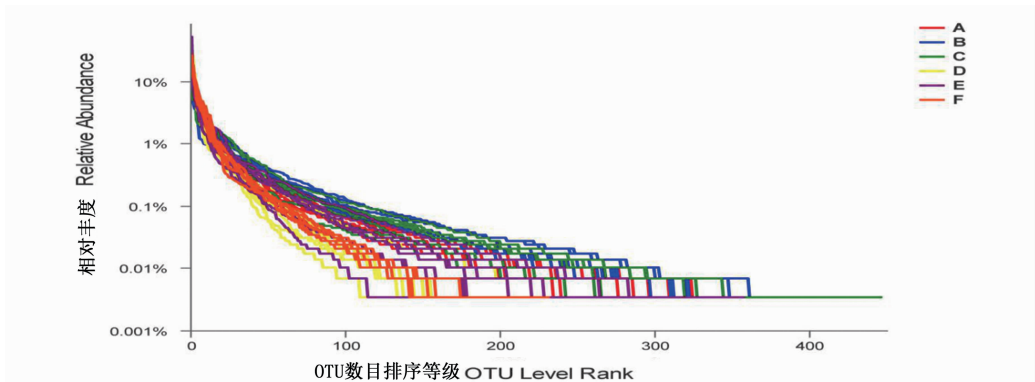


A:空白组;B:模型组;C:二甲双胍组;D:黄连组;E:肉桂组;F:黄连肉桂组。

A: Blank group; B: Model group; C: Metformin group; D: Coptis group; E: Cinnamon bark group; F: Coptis and cinnamon bark group.

图 2 门级菌落热图分析

Fig. 2 Community heatmap analysis on Phylum level

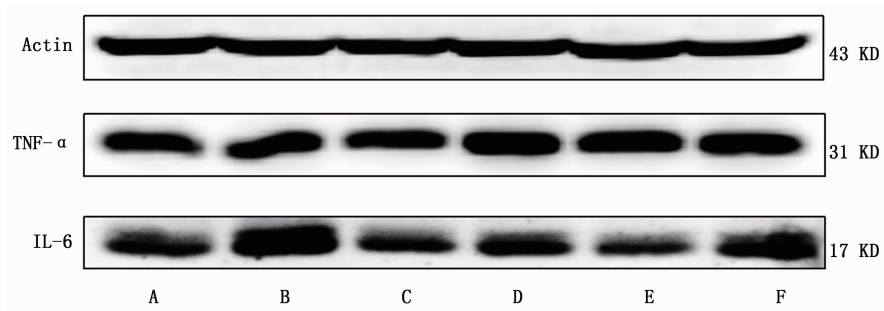


A:空白组;B:模型组;C:二甲双胍组;D:黄连组;E:肉桂组;F:黄连肉桂组。

A: Blank group; B: Model group; C: Metformin group; D: Coptis group; E: Cinnamon bark group; F: Coptis and cinnamon bark group.

图 3 Rank-Abundance 曲线图

Fig. 3 Rank-Abundance curve graph



A:空白组;B:模型组;C:二甲双胍组;D:黄连组;E:肉桂组;F:黄连肉桂组。

A: Blank group; B: Model group; C: Metformin group; D: Coptis bark group; E: Cinnamon group; F: Coptis bark and cinnamon group.

图 4 肝脏组织 TNF-α、IL-6 表达

Fig. 4 Expression of TNF-α and IL-6 in liver tissue

表3 各组小鼠肝脏炎症因子表达 (ng/L; $\bar{x} \pm s$; $n=6$)Table 3 Expression of inflammatory factors in the liver of mice in each group (ng/L; $\bar{x} \pm s$; $n=6$)

组别 Groups	剂量 Dose (g/kg)	TNF- α	IL-6
空白组 Blank group		0.382 \pm 0.553	0.481 \pm 0.407
模型组 Model group		2.151 \pm 0.762*	1.367 \pm 0.205*
二甲双胍组 Metformin group	0.23	0.711 \pm 1.180	0.696 \pm 0.511
黄连组 Coptis group	18.20	0.679 \pm 1.162	0.576 \pm 0.549#
肉桂组 Cinnamon bark group	1.82	1.046 \pm 1.046	0.571 \pm 0.468#
黄连肉桂组 Coptis & cinnamon bark group	18.20 + 1.82	0.142 \pm 0.128#	0.245 \pm 0.225#
<i>F</i>		1.899	2.494
<i>P</i>		0.168	0.090

注:与空白组比较 * $P < 0.05$; 与模型组比较# $P < 0.05$ 。

Note: * $P < 0.05$ compared with the blank group; # $P < 0.05$ compared with the model group.

表4 各组小鼠 SCFAs 值 (mg/L; $\bar{x} \pm s$; $n=6$)Table 4 SCFAs values of mice in each group (mg/L; $\bar{x} \pm s$; $n=6$)

组别 Groups	剂量 Dose (g/kg)	乙酸 Acetic acid	丙酸 Propionic acid	丁酸 Butyric acid
空白组 Blank group		1.72 \pm 0.60*	0.46 \pm 0.07*	0.37 \pm 0.13*
模型组 Model group		1.04 \pm 0.20	0.22 \pm 0.10	0.21 \pm 0.04
二甲双胍组 Metformin group	0.23	1.40 \pm 0.20	0.33 \pm 0.08*	0.34 \pm 0.09*
黄连组 Coptis group	18.20	1.39 \pm 0.33	0.31 \pm 0.07	0.37 \pm 0.11*
肉桂组 Cinnamon bark group	1.82	1.32 \pm 0.22#	0.32 \pm 0.07*	0.32 \pm 0.09
黄连肉桂组 Coptis & cinnamon bark group	18.20 + 1.82	1.71 \pm 0.17*#	0.34 \pm 0.11*	0.42 \pm 0.13*
<i>F</i>		3.714	5.551	3.011
<i>P</i>		0.010	0.001	0.026

注:与模型组比较 * $P < 0.05$, 与黄连肉桂组比较# $P < 0.05$ 。

Note: * $P < 0.05$ compared with model group; # $P < 0.05$ compared with coptis and cinnamon bark group.

而导致肥胖及 T2DM 的发生发展^[12]。肠道菌群门级群落可分为 5 大类,包括厚壁菌门、拟杆菌门、变形杆菌门、放线菌门和梭形杆菌门,其中约 90% 由厚壁菌门和拟杆菌门构成。拟杆菌门和厚壁菌门的相对丰度和肥胖密切相关,肥胖小鼠具有更多的厚壁菌门,因为厚壁菌门能摄取更多的能量,使体重增加^[13-14]。这与我们的研究结果一致,也说明了二甲双胍组小鼠体重升高最明显的原因,而中药组的小鼠体重升高趋势减缓,黄连肉桂可以有效地减少

3.5 对 db/db 小鼠 SCFAs 的影响

乙酸含量:与空白组相比,模型组明显降低 ($P < 0.05$);与模型组相比黄连肉桂组增加 ($P < 0.05$);黄连肉桂组较肉桂组相比乙酸含量增加 ($P < 0.05$)。

丙酸含量:与空白组相比,模型组小鼠明显降低 ($P < 0.05$);二甲双胍组、肉桂组、黄连肉桂组较模型组明显增加 ($P < 0.05$)。

丁酸含量:与空白组相比,模型组小鼠明显降低 ($P < 0.01$),二甲双胍组、黄连组、黄连肉桂组明显优于模型组 ($P < 0.05$)。结果见表 4。

4 讨论

肠道菌群对 T2DM 发生发展的影响是近几年的研究热点,在正常情况下,各类肠道菌群之间可以互相制约,达到一定的生态平衡,与人类形成共生关系,这是维护人体健康的重要环节。如果这种平衡被打破,将会导致各种疾病的发生,如肥胖及 T2DM。肠道菌群的结构和功能受到饮食、免疫、药物等多种因素的影响,菌群可以通过改变代谢的途径和介导炎症免疫反应等影响人体的糖脂代谢,从

db/db 小鼠的厚壁杆菌丰度。

肠道菌群的紊乱可以破坏肠道屏障,导致革兰氏阴性菌释放内毒素入血,继发患者全身炎症反应的发生,诱导机体产生胰岛素抵抗,促进 T2DM 的发生^[15]。研究证实,TNF- α 在肥胖和 T2DM 患者的脂肪组织中有着较高的水平及生物活性^[16-17]。TNF- α 是由单核细胞、巨噬细胞等分泌合成的,能够促进炎症反应的发生,抑制脂肪、肌肉上的葡萄糖转运蛋白和胰岛素依赖的葡萄糖转运,干扰胰岛的功能,促

进胰岛素的抵抗进而影响葡萄糖的正常代谢。本实验中黄连肉桂可以有效降低 db/db 小鼠肝脏中 TNF- α 的表达,改善其胰岛素抵抗状态,降低血糖。白细胞介素 6(IL-6)由 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、单核巨噬细胞等分泌,在免疫和炎症反应中有着非常重要的作用^[18]。健康人的外周血中 IL-6 含量较低,但在 2 型糖尿病患者体内 IL-6 分泌量异常升高^[19]。IL-6 能促进炎症和胰岛素抵抗的发生,脂肪是血循环中 IL-6 的重要来源,超重患者体内的 IL-6 可通过激活 Fas 基因转录,诱导 β 细胞凋亡,IL-6 水平与 β 细胞损伤程度成正比^[20]。此次实验中,黄连肉桂组与模型组相比,肝脏中 IL-6 表达明显降低,改善小鼠胰岛素抵抗的状态,减缓体重增长趋势。

SCFAs 是膳食纤维被肠道菌群发酵后的主要产物,主要包括乙酸、丙酸和丁酸。研究显示,SCFAs 可以通过对瘦素和促使饥饿激素的消耗增加肠道 YY 肽和胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 的表达,减缓肠道传输时间,增强胰岛素敏感性来降低食欲等^[21],还可以增加远端肠道 L 细胞分泌 GLP-1,参与血糖调节。另有研究发现,增添 SCFAs 的膳食有益于血糖调节及胰岛素敏感性的改善,增加空腹脂肪氧化,降低空腹游离甘油浓度,增强能量的消耗,减轻体重及调节血糖等^[22]。其中,乙酸可以有效刺激胰岛 β 细胞,促进其分泌胰岛素;丙酸对胆固醇的合成有抑制作用,进而可以降低血脂;丁酸作为肠上皮细胞的主要能量来源,可以有效维持能量平衡和保持胰岛素敏感性,同时丁酸能够抑制 TNF- α 的释放^[23],本次研究中黄连肉桂可以有效的提高小鼠体内乙酸、丙酸及丁酸的含量,这与我们此次的研究一致。同时,已有实验证实,SCFAs 产生与肠道中的放线菌门假链状双歧杆菌关系密切^[24]。同时厚壁杆菌的丰度减少,本实验研究显示肉桂组及黄连肉桂组放线菌门的丰度增加,这可能是黄连肉桂降糖的机制之一。

黄连、肉桂有很好的降糖作用。黄连主要成分小檗碱,含量 3.6% 以上。小檗碱是公认的腺苷酸活化的蛋白激酶(AMPK) 激活剂,其治疗 2 型糖尿病有效的临床和实验研究已有较多报道^[25]。肉桂的主要成分为桂皮醛和肉桂酸,已证实肉桂酸可促进 β 细胞的胰岛素分泌^[26],黄连与肉桂临床用于糖尿病的治疗效果显著,可以有效改善糖尿病患者高血糖状态。

本次研究以 db/db 小鼠为研究对象,分别用目前公认的一线降糖药二甲双胍和单味黄连、肉桂以

及黄连联合肉桂作为干预措施,从肠道菌群、炎症因子的表达及 SCFAs 几个方面探讨黄连肉桂治疗 T2DM 的机制,研究表明,黄连肉桂可以有效地降低 db/db 小鼠高血糖状态,减缓 db/db 小鼠体重增长趋势,可能与其可以有效调节 db/db 小鼠肠道菌群、改善炎症反应以及增加 SCFAs 含量有关。本实验为黄连肉桂降糖的应用及机制研究提供了数据支持。

参考文献:

- [1] Wang LM, Gao P, Zhang M, et al. Prevalence and ethnic pattern of diabetes and prediabetes in China in 2013 [J]. JAMA, 2017,317(24):2515-2523.
- [2] 贺云, 杨丽霞, 邱连利. 从肠道微生态角度探讨 2 型糖尿病的发病机制以及治疗措施 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020,26(15):229-234.
He Y, Yang LX, Qiu LL. Discussion on the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes from the perspective of intestinal microecology [J]. Chinese Journal of Experimental Formulas, 2020,26(15):229-234.
- [3] 郭丽璇, 胡琼英, 熊大迁. 肠道菌群调控 2 型糖尿病发生发展的研究进展 [J]. 实用医学杂志, 2020,36(9):1142-1147.
Guo LX, Hu QY, Xiong DQ. Research progress on intestinal flora regulating the occurrence and development of type 2 diabetes [J]. The Journal of Practical Medicine, 2020,36(9):1142-1147.
- [4] Canfora EE, Jocken JW, Blaak EE. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity [J]. Endocrinology, 2015,11(10):577-591.
- [5] 吕海永, 全春花. 基于肠道菌群治疗糖尿病的研究进展 [J]. 吉林医学, 2020,41(3):701-704.
Lyu HY, Quan CH. Research progress in the treatment of diabetes based on intestinal flora [J]. Jilin Medicine, 2020,41(3):701-704.
- [6] Nguyen AT, Mandard S, Dray C, et al. Lipopolysaccharides-mediated increase in glucose-stimulated insulin secretion: involvement of the GLP-1 pathway [J]. Diabetes, 2014,63(2):471.
- [7] 周长征. 黄连—肉桂药对的研究综述 [J]. 齐鲁药事, 2011,30(2):109-111.
Zhou CZ. Review of research on drug pair of coptis and cassia [J]. Qilu Pharmaceutical Affairs, 2011,30(2):109-111.
- [8] 许啸虎, 周姗姗, 邹欣, 等. 交泰丸对 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢及肾脏保护作用的实验研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2018,38(2):111-115.
Xu XH, Zhou LS, Zou X, et al. Effects of Jiaotai Pills against glucolipid metabolism disturbance and renal impairment

- ment in type 2 diabetic rats[J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2018,38(2):111-115.
- [9] 汤鹏, 胡娜, 袁琳, 等. 交泰丸对 db/db 小鼠的治疗作用及其脂肪组织 PGC-1 α 、GLUT4 基因表达的影响[J]. *中国中医药科技*, 2014,21(6):630-632.
- Tang P, Hu N, Yuan L, et al. Therapeutic effects of Jiaotai Pills on db/db mice and their effects on the expression of PGC-1 α and GLUT4 genes in adipose tissue[J]. *China Traditional Chinese Medicine Science and Technology*, 2014,21(6):630-632.
- [10] 陆洁, 刘静, 裴天仙, 等. 自发性 2 型糖尿病模型 db/db 小鼠生物学特性研究[J]. *药物评价研究*, 2013,36(5):341-345.
- Lu J, Liu J, Pei TX, et al. Biological characteristics of spontaneous type 2 diabetes model db/db mice[J]. *Drug Evaluation Research*, 2013,36(5):341-345.
- [11] 徐叔云. *药理实验方法学*[M]. 北京:人民卫生出版社, 1982:120-121.
- Xu SY. *Experimental Methodology of Pharmacology*[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1982:120-121.
- [12] Lazar V, Ditu L, Pircalabioru GG, et al. Gut microbiota, host organism, and diet triologue in diabetes and obesity[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2019,6(21):6731-6739.
- [13] Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest[J]. *Nature*, 2006,444(7122):1027-1031.
- [14] Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice[J/OL]. *Science*, 2013,341(6150)[2020-08-10]. <https://science.sciencemag.org/content/341/6150/1241214>. DOI:10.1126/science.1241214.
- [15] Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance[J]. *Diabetes*, 2007,56(7):1761-1772.
- [16] 沈寒蕾, 赖战峰, 谭晓丹, 等. 2 型糖尿病患者血浆内脂素与炎症因子的相关性研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2012,22(7):44-47.
- Shen HL, Lai ZF, Tan XD, et al. Study on the correlation between plasma visfatin and inflammatory factors in patients with type 2 diabetes[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2012,22(7):44-47.
- [17] 聂益军, 吴红. P2X₇ 受体、TNF- α 、IL-10 及 IL-1 β 与 2 型糖尿病的相关性研究[J]. *实验与检验医学*, 2015,33(4):410-413.
- Nie YJ, Wu H. The correlation between P2X₇ receptor, TNF- α , IL-10 and IL-1 β and type 2 diabetes[J]. *Experimental and Laboratory Medicine*, 2015,33(4):410-413.
- [18] 赖锦茂, 魏远南, 张四青. 2 型糖尿病患者促甲状腺激素水平与糖尿病视网膜病变关系的探讨[J]. *江西医药*, 2019,54(9):1071-1072.
- Lai JM, Wei YN, Zhang SQ. The relationship between thyroid-stimulating hormone levels and diabetic retinopathy in type 2 diabetes patients[J]. *Jiangxi Medicine*, 2019,54(9):1071-1072.
- [19] 孙洪岩, 滕岩, 杨明明. 自噬的分子机制及其在糖尿病视网膜病变中的作用[J]. *眼科新进展*, 2019,39(10):984-987.
- Sun HY, Teng Y, Yang MM. The molecular mechanism of autophagy and its role in diabetic retinopathy[J]. *New Advances in Ophthalmology*, 2019,39(10):984-987.
- [20] 杨帆, 杨立, 许旌, 等. 老年 2 型糖尿病患者的炎症因子水平与认知功能障碍的关系[J]. *卒中与神经疾病*, 2014,21(3):169-173.
- Yang F, Yang L, Xu J, et al. The relationship between the level of inflammatory factors and cognitive dysfunction in elderly patients with type 2 diabetes[J]. *Stroke and Neurological Diseases*, 2014,21(3):169-173.
- [21] Kellow NJ, Coughlan MT, Reid CM. Metabolic benefits of dietary prebiotics in human subjects: a systematic review of randomised controlled trials[J]. *British Journal of Nutrition*, 2014,111(7):1147-1161.
- [22] Canfora EE, van der Beek CM, Jocken JW, et al. Colonic infusions of short-chain fatty acid mixtures promote energy metabolism in overweight/obese men: a randomized crossover trial[J]. *Scientific Reports*, 2017,7(1):1-12.
- [23] 崔祥, 陶金华, 江曙, 等. 肠道菌群与 2 型糖尿病相关性的研究进展[J]. *中国微生态学杂志*, 2017,29(11):1346-1349.
- Cui X, Tao JH, Jiang S, et al. Research progress on the relationship between intestinal flora and type 2 diabetes[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2017,29(11):1346-1349.
- [24] Zhao L, Zhang F, Ding X, et al. Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes[J]. *Science*, 2018,359(6380):1151-1156.
- [25] Dong H, Wang N, Zhao L, et al. Berberine in the treatment of type 2 diabetes mellitus: a systemic review and meta-analysis[J/OL]. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2012,2012[2020-08-20]. <http://doi.org/10.1155/2012/591654>.
- [26] Sirichai A, Preecha M, Sirintorn Y. Insulin-releasing properties of a series of cinnamic acid derivatives in vitro and in vivo[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008,56(17):7838-7844.