

两色金鸡菊醇提物对 2 型糖尿病小鼠肠道菌群的影响

张凯楠¹, 龙梅², 冉新建², 阳迎¹, 仝磊¹, 李清晨¹, 熊健会³,
毛新民⁴, 陶亮³, 李琳琳^{3*}

(新疆医科大学 1. 临床医学院; 2. 基础医学院机能中心实验室; 3. 药理学教研室; 4. 中医学院, 乌鲁木齐 830054)

【摘要】 目的 探讨两色金鸡菊醇提物, 肠道菌群和 2 型糖尿病(T2DM)之间的可能联系。**方法** 收集模型组(A), 两色金鸡菊醇提物高剂量组 1.8 g/kg(B), 两色金鸡菊醇提物中剂量组 1.2 g/kg(C), 二甲双胍对照组 0.2 g/kg(D), 空白对照组(E)粪便样本, 采用 16S rDNA 实时荧光定量 PCR 技术检测粪便样本中球形梭菌与多形拟杆菌的水平; 运用 Pearson 分析方法, 对目标菌属水平与各组小鼠的空腹血糖(FBG)做相关性分析。**结果** ①与正常组比较, 模型组中球形梭菌与多形拟杆菌水平均增高($P=0.017$, $P=0.002$)。②两色金鸡菊醇提物高剂量组与模型组相比, 球形梭菌与多形拟杆菌的水平下降, 且有统计学差异(2 周: $P=0.027$, $P=0.006$; 4 周: $P=0.007$, $P=0.012$)。③球形梭菌水平、多形拟杆菌水平均与 FBG 水平呈正相关。**结论** 两色金鸡菊醇提物对 2 型糖尿病小鼠肠道菌群存在着一定的影响且与其血糖水平存在相关性。

【关键词】 球形梭菌; 多形拟杆菌; 2 型糖尿病; 荧光定量 PCR

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)06-0628-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.06.016

Effect of alcohol extract of *Coreopsis tinctoria* Nutt on intestinal flora in type 2 diabetic mice

ZHANG Kai-nan¹, LONG Mei², RAN Xin-jian², YANG Ying¹, TONG Lei¹, LI Qing-cheng¹,
XIONG Jian-hui³, MAO Xin-min⁴, TAO Liang³, LI Lin-lin^{3*}

(1. The Clinical Medical School, 2. Central Laboratory of Functional Activities, 3. Department of Pharmacology,
4. The School of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumchi 830054, China)

【Abstract】 Objective To study the differences in intestinal flora of normal and type 2 diabetic mice, the effect of alcoholic extract of *Coreopsis tinctoria* Nutt on mouse intestinal flora, and explore the possible relationship between alcoholic extract of *Coreopsis tinctoria* Nutt, intestinal flora and type 2 diabetes mellitus (T2DM) in mice. **Methods** Stool samples were collected from the normal control group (A), high dose (1.8 g/kg) (B) and moderate dose (1.2 g/kg) (C) alcoholic extract of *Coreopsis tinctoria* Nutt model groups, metformin (0.2 g/kg) treatment group (D) and blank control (E) group. 16S rDNA real-time quantitative PCR assay was used to determine the levels of *Clostridium coccoides* and *Bacteroides thetaiotaomicron* in the stool samples. Pearson analysis method was used to analyze the correlation between the levels of target bacterial species and the fasting blood glucose (FBG) in the mice. **Results** 1. Compared with the normal control group, the levels of *Clostridium coccoides* and *Bacteroides thetaiotaomicron* in the T2DM model group were significantly lowered ($P=0.017$, $P=0.002$). 2. Compared with the model group, the levels of *Clostridium coccoides* and *Bacteroides thetaiotaomicron* of the high dose *Coreopsis tinctoria* Nutt alcohol extract group were significantly different (2 weeks: $P=0.027$, $P=0.006$; 4 weeks: $P=0.007$, $P=0.012$). 3. The levels of *Clostridium coccoides* and *Bacteroides thetaiotaomi-*

[基金项目] 新疆创新药物临床前药效学评价技术平台建设(201233150); S RTP(20140760002)。

[作者简介] 张凯楠(1991-), 男, 从事糖尿病药理研究, Tel:15699220218, E-mail: 296177817@qq.com。

[通讯作者] 李琳琳, 教授, 邮箱: yz-lll@vip.sina.com, 研究方向: 糖尿病药理。

cron were positively correlated with the FBG level in the mice. **Conclusions** The alcohol extract of *Coreopsis tinctoria* Nutt has certain effect on the intestinal flora in type 2 diabetic mice and there is certain correlation between the effect of alcohol extract of *Coreopsis tinctoria* Nutt and their blood glucose level.

【Key words】 *Clostridium coccoides*; *Bacteroides thetaiotaomicron*; Type 2 diabetes mellitus; Real-time PCR

据 2013 年 9 月《美国医学会杂志》报道的调查显示,我国 18 岁及以上成年人糖尿病患者达 1.14 亿人,患病率高达 11.6%^[1],其中 2 型糖尿病(T2DM)占 90% 以上。T2DM 是多种因素联合作用而导致的胰岛素抵抗^[2]。近期有研究表明,肠道菌群很可能与肥胖、2 型糖尿病等代谢性疾病的发生发展有密切联系^[3-5]。

人的肠道定植着复杂多样而又相对稳定的菌群,其对正常代谢起着较为重要的作用。球形梭菌是人类粪便中数量较多的菌群之一,参与构成宿主微生态系统,发挥维持微生态平衡、调节免疫等多方面的生理作用^[7]。多形拟杆菌能降解不被人体消化和吸收的植物多糖(如纤维素等)。人体肠道几乎不含多糖消化酶,但多形拟杆菌却能解多糖,为宿主提供额外的能量,从而升高血糖。与此同时给予 2 型糖尿病大鼠补充益生菌,其胰岛 β 细胞得到保护,血糖、血浆总胆固醇显著降低^[6]。这些研究均提示了肠道菌群与肥胖、2 型糖尿病发生密切相关。

两色金鸡菊又名昆仑雪菊,是新疆地方特色药物之一,具有清热解毒、活血化瘀之效,可治疗燥热烦渴、高血压、心慌、胃肠不适等症状^[8-9]。黄元等^[10]研究发现,某些高寒菊科植物提取物能显著抑制 α -葡萄糖苷酶活性。 α -葡萄糖苷酶是一种在机体的代谢过程中起着关键作用的酶,它能使复合碳水化合物分解成可被人体吸收的单糖^[11-12]。 α -葡萄糖苷酶抑制剂能通过抑制该酶的活性,延缓糖类的吸收,可有效降低餐后血糖浓度峰值,提高糖耐量,预防并改善糖尿病及其并发症的发生和发展^[13]。骆新^[14]在昆仑雪菊对 2 型糖尿病大鼠的研究中显示:能有效的降低 2 型糖尿病大鼠的血糖,血脂水平。根据以上的研究,发现两色金鸡菊对降低血糖有一定的功效。

故本实验拟通过各组小鼠粪便中球形梭菌与多形拟杆菌的水平,分析球形梭菌与多形拟杆菌与 2 型糖尿病的相关性,初步判断两色金鸡菊醇提物对小鼠肠道菌群的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 ICR 雄性小鼠 70 只,购自新疆医科大学动物实验中心【SCXK(新) 2011-0003】,周龄 5 周,体重 22 g 左右,饲养于新疆医科大学动物实验中心【SYXK(新) 2011-0001】。昼夜明暗交替时间 12 h/12 h,温度(21 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度 45%~55%,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 仪器与试剂

两色金鸡菊醇提物(专利申请中,申请号:20120270752.0);实时荧光定量仪(美国 Bio-Rad IQ5,);凝胶成像仪(AlphaImager HP);微量分光光度计(美国 Thermo ND-2000);天根粪便基因组提取试剂盒(中国天根生化科技有限公司)No: DP328-02);SYBR Green PCR kit(德国 Qiagen 公司);所用引物均参照文献,由北京六合华大基因科技股份有限公司合成,多形拟杆菌^[21](F:TCGAAAGTGTGGG-TATCAACA, R: CTGTATATCGCAAACAGCGAGT, T_m = 55.0 $^{\circ}\text{C}$);球形梭菌^[15](F: AATGACGGTACCT-GACTAA, R: CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA, T_m = 50.0 $^{\circ}\text{C}$)

1.3 方法

1.3.1 四氧嘧啶糖尿病模型小鼠的建立

SPF 级 ICR 小鼠,雄性,体重 22 g 左右,高糖高脂饮食(葡萄糖 20%,猪油 10%,胆固醇 2.5%,胆酸钠 0.5%)喂养 4 周,禁食 8~10 h 后,腹腔注射四氧嘧啶溶液(美国 Sigma CAS: 2244-11-3) 180 mg/kg 造模,72 h 后,禁食 8~12 h 测小鼠空腹血糖。以空腹血糖 $\geq$ 11.1 mmol/L 为造模成功。

1.3.2 小鼠的分组

选取成模小鼠 40 只,依照血糖体重水平随机分成 4 组,依次为模型组(A),两色金鸡菊醇提物高剂量组 1.8 g/kg(B),两色金鸡菊醇提物中剂量组 1.2 g/kg(C),二甲双胍(中美上海施贵宝制药有限公司 国药准字 H20023370)对照组 0.2 g/kg(D),通过次对照组对比两色金鸡菊醇提物与目前临床一线

用药的效能。再选取 10 只正常小鼠作为空白对照组(E)。

1.3.3 粪便的收集粪样肠道微生物总 DNA 提取

粪便样品细菌总 DNA 的提取按照天根粪便基因组提取试剂盒(中国天根生化科技有限公司)的使用说明进行操作。用微量分光光度计检测 DNA 浓度与纯度。

1.3.4 实时荧光定量 PCR 检测目标菌群水平。

1.3.5 标准品的配制

分别以球形梭菌与多形拟杆菌 16S rDNA 可变区引物进行 PCR 扩增,分别将球形梭菌与多形拟杆菌的 PCR 扩增目标片段切胶、回收后作为 DNA 标准品,具体操作步骤按照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(天根生化科技有限公司)说明进行。

1.3.6 目标菌群水平的检测

将标准品稀释后浓度梯度为 $10^1 \sim 10^8$ copies/ μ L 的 DNA 样本为模板,同时以去核酸水作为阴性对照,进行荧光定量 PCR。每个样本平行重复 2 次,反应体系及程序如下:

(1)反应体系(20 μ L):上游引物 0.5 μ L;下游引物 0.5 μ L;荧光染料 SYBR Green I 10 μ L;模板 2.0 μ L;免酶水补水至 20 μ L。

(2)反应程序:①预变性:95 $^{\circ}$ C 10 min,1 个循环;② PCR 反应 95 $^{\circ}$ C 15 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,40

个循环。

1.3.7 统计分析

文中所有数据均采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据整理和统计,数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。计量资料运用单因素方差分析进行各组间比较,以 Pearson 相关系数评价变量间相关性,得出 r 值。 $P < 0.05$, $P < 0.01$ 差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 DNA 的纯度检测

采用微量分光光度计测定细菌总 DNA 浓度, A260/A280 的比值均在 1.6 ~ 1.8,说明样品 DNA 的纯度较好,无蛋白质污染。

2.2 球形梭菌与多形拟杆菌在五组粪样中 16S rDNA 实时荧光定量 PCR 结果

与正常组比较,模型组中球形梭菌水平、多形拟杆菌水平均增高;两色金鸡菊醇提取物高剂量组与模型组相比,球形梭菌与多形拟杆菌的水平下降,且有统计学差异。见表 1,2。见图 1,2。

2.3 相关性分析

分别将球形梭菌、多形拟杆菌水平与 FBG 水平进行 Pearson 相关性分析,球形梭菌、多形拟杆菌水平均与 FBG 水平呈正相关,见图 3。

表 1 五组样本中球形梭菌起始模板量对数值比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 1 Numeric comparisons of Clostridium Coccoides starting template in the samples of five groups

组别 (Groups)	0 周 (0 week)	2 周 (2 weeks)	4 周 (4 weeks)
模型组 (Model group)	5.79 $\pm$ 0.20 [#]	5.81 $\pm$ 0.19	5.89 $\pm$ 0.35
两色金鸡菊醇提取物高剂量组 (High dose group)	5.91 $\pm$ 0.26 [#]	5.47 $\pm$ 0.30 ^{* &}	5.42 $\pm$ 0.34 ^{**}
两色金鸡菊醇提取物中剂量组 (Moderate dose group)	6.03 $\pm$ 0.60 [#]	5.44 $\pm$ 0.55 ^{* &}	5.61 $\pm$ 0.37 [*]
二甲双胍对照组 (Metformin group)	5.99 $\pm$ 0.11 [#]	6.11 $\pm$ 0.50 ^{**}	5.53 $\pm$ 0.34 [*]
空白对照组 (Blank group)	5.35 $\pm$ 0.30	5.32 $\pm$ 0.19 ^{**}	5.39 $\pm$ 0.34 ^{**}

注: [#]: 与空白对照组比较; ^{*}: 与模型组比较; [&]: 与二甲双胍对照组比较。

Note. [#]. Compared with the blank group. ^{*}. Compared with the model group. [&]. Compared with the metformin group.

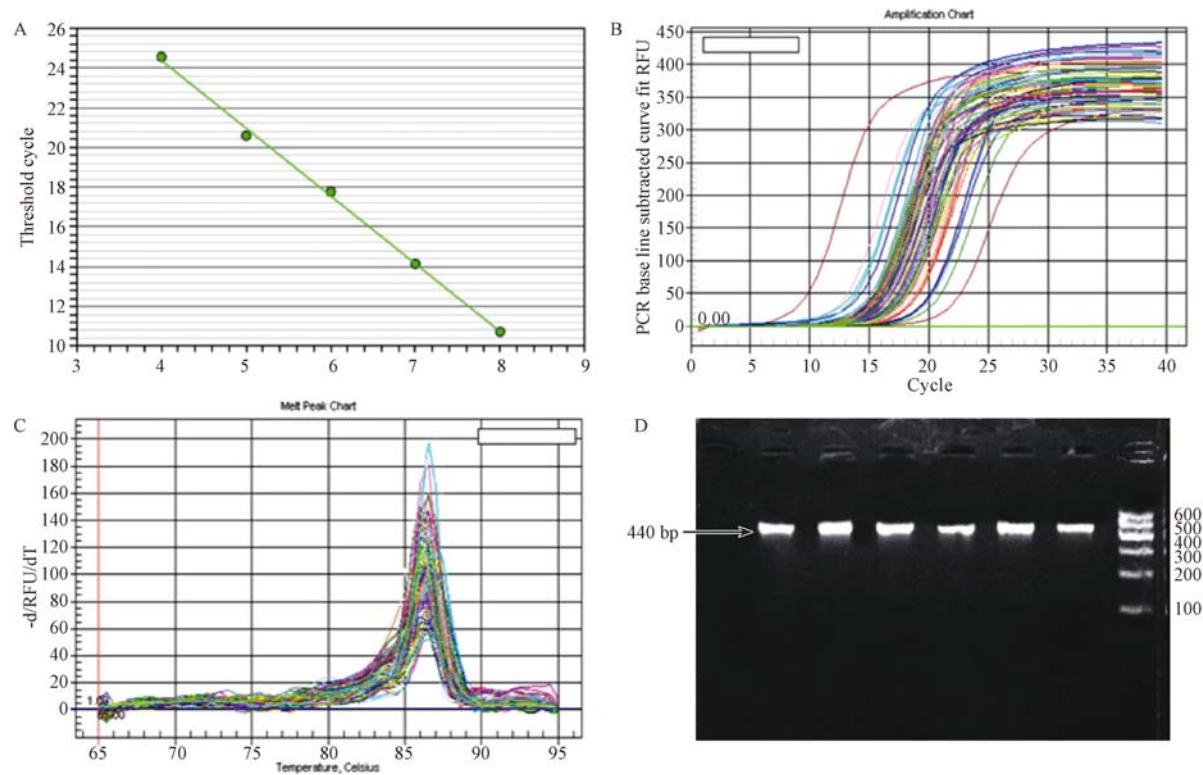
表 2 五组样本中多形拟杆菌起始模板量对数值比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 2 Numeric comparisons of Bacteroides thetaiotaomicron starting template in the samples of five groups($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 (Groups)	0 周 (0 week)	2 周 (2 weeks)	4 周 (4 weeks)
模型组 (Model group)	4.45 $\pm$ 0.32 [#]	4.63 $\pm$ 0.16	4.97 $\pm$ 0.37
两色金鸡菊醇提取物高剂量组 (Hight dose group)	4.38 $\pm$ 0.51 [#]	4.16 $\pm$ 0.32 ^{**}	4.44 $\pm$ 0.16 [*]
两色金鸡菊醇提取物中剂量组 (Moderate dose group)	4.44 $\pm$ 0.26 [#]	4.71 $\pm$ 0.12	4.46 $\pm$ 0.29 [*]
二甲双胍对照组 (Metformin group)	4.30 $\pm$ 0.45 [#]	4.46 $\pm$ 0.05 [*]	4.46 $\pm$ 0.47 [*]
空白对照组 (Blank group)	4.80 $\pm$ 0.13	4.53 $\pm$ 0.40 [*]	4.55 $\pm$ 0.35 [*]

注: [#]: 与空白对照组比较; ^{*}: 与模型组比较; [&]: 与二甲双胍对照组比较。

Note. [#]. Compared with the blank group. ^{*}. Compared with the model group. [&]. Compared with the metformin group.

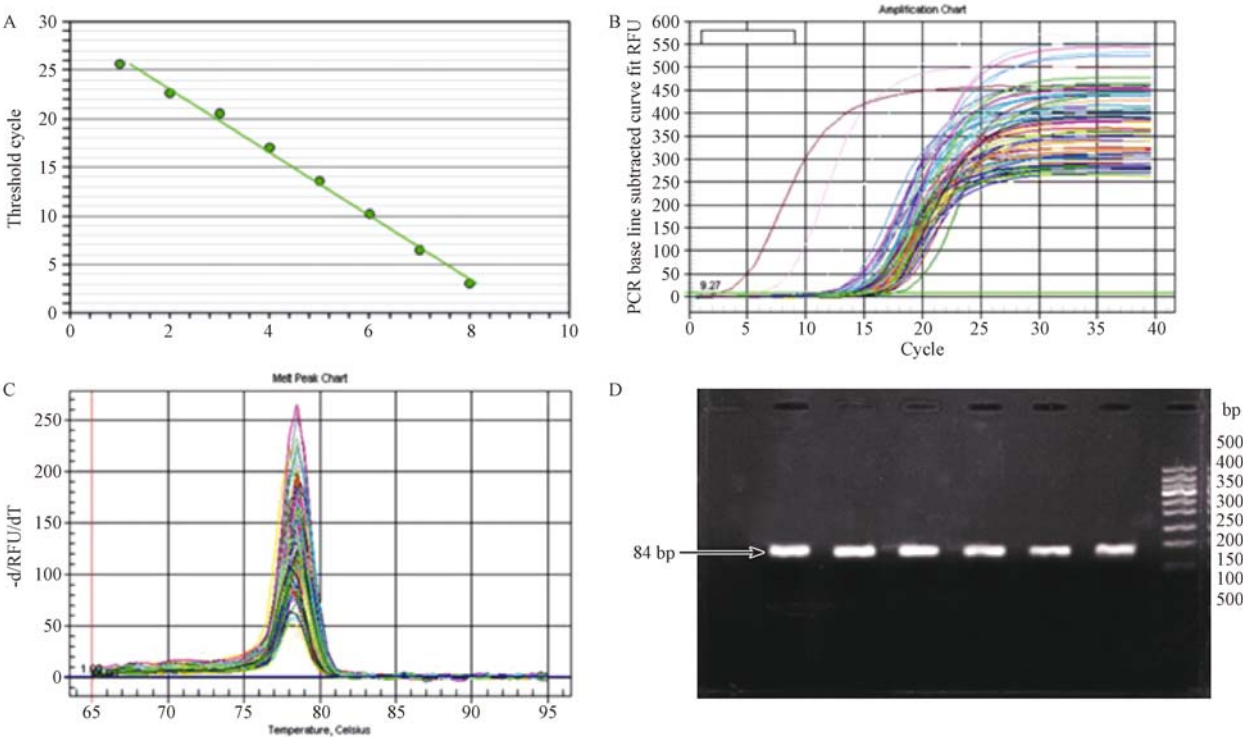


注: A: 标准曲线; B: 扩增曲线; C: 熔点曲线; D: 凝胶电泳。

图 1 球形梭菌荧光定量 PCR 检测图

Note. A. Standard curve. B. Amplification curve. C. Melting point curve. D. Gel electrophoresis.

Fig. 1 Quantitative real-time PCR detection of *Clostridium coccooides*



注: A: 标准曲线; B: 扩增曲线; C: 熔点曲线; D: 凝胶电泳。

图 2 多形拟杆菌荧光定量 PCR 检测图

Note. A. Standard curve. B. Amplification curve. C. Melting point curve. D. Gel electrophoresis.

Fig. 2 Quantitative real-time PCR detection of *Bacteroides thetaiotaomicron*

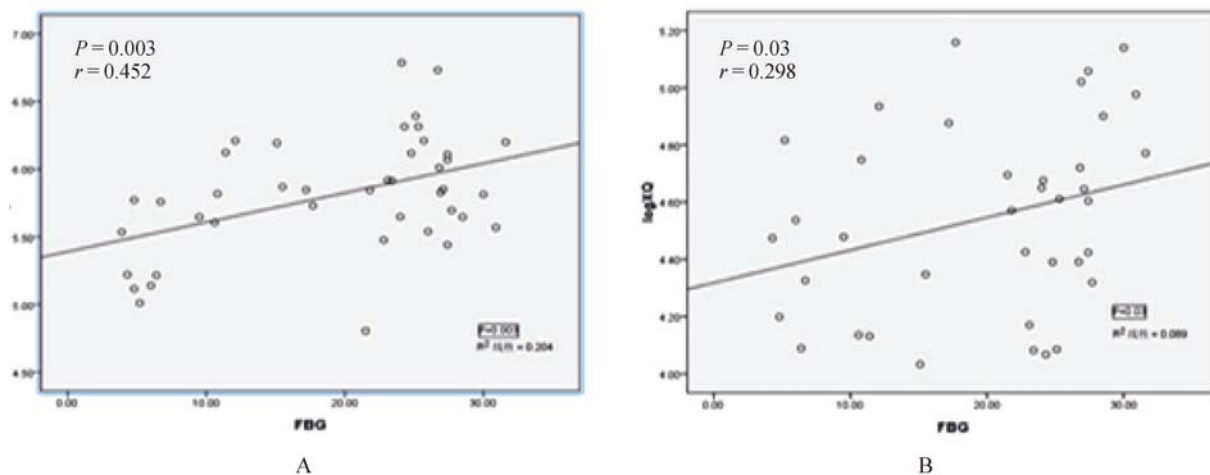


图3 四组样本中球形梭菌(A)、多形拟杆菌(B)水平与空腹血糖水平的相关性

Fig.3 The correlation of *Clostridium coccoides* (A) and *Bacteroides thetaiotaomicron* (B) with fasting glucose level in the four groups.

3 讨论

实时荧光定量 PCR (RTFQ-PCR) 是 20 世纪 90 年代推出的技术,其利用染料和双链 DNA 结合,在 PCR 反应过程中荧光信号的改变来进行定量。相对于传统的菌群检测方法,RTFQ-PCR 具有更高的灵敏度及特异性,并且操作简单快速,近年来已逐步成为检测菌群的主要手段。

本研究针对肠道菌群中球形梭菌和拟杆菌,进行 RTFQ-PCR 检测,比较各组之间小鼠肠道菌群表达的差异,得出以下结果:①与正常组比较,模型组中球形梭菌与多形拟杆菌水平均增高。②两色金鸡菊醇提取物高剂量组与模型组相比,球形梭菌与多形拟杆菌的水平下降,且有统计学差异。③球形梭菌水平、多形拟杆菌水平均与 FBG 水平呈正相关。

球形梭菌是肠道内最为常见的类群之一。研究表明,这个类群的大部分细菌能帮助宿主从饮食中吸收能量,从而与肥胖、糖尿病代谢性疾病的发生相关^[16]。厚壁菌门具有降解人体所不能降解的多糖进而为人体提供能量的作用。Gordon 等^[17]也发现的肥胖人群中肠道球形梭菌增多并提示其与能量代谢有一定关系。同时多形拟杆菌也有降解多糖的能力,提高人体对营养物质的吸收与利用^[18]。张丽萍等^[19]的研究显示,多形拟杆菌可使宿主更为高效的吸收糖。同时 Nadja 等的研究发现,糖尿病患者和正常患者相比,其拟杆菌水平与血糖呈正相关,即血糖水平随拟杆菌数量的增高而增高^[20]。在这基础之上,谢婧雯等^[21]的研究也初步提示,多形拟杆菌

与血糖水平存在正相关。以上的研究得到的成果与本研究得出的结论相似。

两色金鸡菊作为新疆地方特色药物,其药用价值正在被逐渐发现,近年来越来越多的研究提示,两色金鸡菊具有降糖作用^[14,22-24],其机制可能与其抑制 α -葡萄糖苷酶有关,但目前尚未明确,故本研究拟通过其对肠道菌群的影响发现其可能的药理机制。在本研究中,通过对两色金鸡菊醇提取物高剂量组与其他各组之间多形拟杆菌、球形梭菌水平进行比较,发现:两色金鸡菊醇提取物干预组多形拟杆菌、球形梭菌水平较模型组表达均下降,且有统计学差异,但与正常对照组及二甲双胍阳性对照组并无差异,这可能提示着,两色金鸡菊醇提取物对肠道菌群具有一定的保护作用,是其趋于正常。同时,与当今主流降糖药物二甲双胍作对比,并没有发现其具有统计学差异(给药 4 周),表明其降糖效果及对肠道菌群的影响与二甲双胍类似,证明其功效在一定程度上可信。与此同时,发现菌群表达水平与血糖高低存在正相关性。可能提示,菌群数量的改变与血糖升高程度有一定的相关因素,但尚不能明确。

通过上述的研究,可以做出初步推断即两色金鸡菊醇提取物对于 T2DM 小鼠具有一定的降糖功效,其功能的实现可能与其对肠道菌群表达水平的影响存在着一定的联系,可能的机制为保护了肠道益生菌并抑制有害菌的表达水平。具体机制的确定以待进一步研究证明,课题组将继续以肠道菌群为突破口,研究其具体的药理机制。

参 考 文 献

- [1] Xu Y, Wang L, He J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults [J]. JAMA, 2013, 310(9): 948–959.
- [2] Basevi V, Di Mario S, Morciano C, et al. Comment on: American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes—2011 [J]. Diabetes Care, 2011, 34 (Suppl. 1): S11–S61.
- [3] Membrez M, Blancher F, Jaquet M, et al. Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice [J]. FASEB J, 2008, 7(20): 2416–2426.
- [4] Xu J, Lian F, Zhao L, et al. Structural modulation of gut microbiota during alleviation of type 2 diabetes with a Chinese herbal formula [J]. ISME J, 2015, 9(3): 552–562.
- [5] Wang J, Tang H, Zhang C, et al. Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice [J]. ISME J, 2015, 9(1): 1–15.
- [6] Yadav H, Jain S, Sinha PR. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats [J]. Nutrition, 2007, 23(1): 62–68.
- [7] Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora [J]. Science, 2005, 308(5728): 1635–1638.
- [8] 李长贵, 宁光, 陈家伦. 胰岛素抵抗 HepG2 细胞模型的建立及鉴定 [J]. 中国糖尿病杂志, 1999, 7(4): 198–200.
- [9] 李倩, 王继红, 王欣, 等. 人肝细胞系 L02 胰岛素抵抗细胞模型的建立及鉴定 [J]. 现代预防医学, 2007, 34(22): 4233–4234.
- [10] 程万里. 高糖、高脂肪饮食诱导胰岛素抵抗大鼠肝细胞过氧化物酶体脂肪酸 β -氧化的研究 [D]. 河北医科大学硕士学位论文, 2006. 35.
- [11] 张伟, 海春旭, 梁欣, 等. 高脂高糖加氧化剂 tBHP 诱导胰岛素抵抗大鼠模型的建立 [J]. 毒理学杂志, 2009, 23(1): 44–47.
- [12] McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes [J]. Diabetes. Diabetes, 2002, 51: 7–8.
- [13] 龚燕平, 李春霖, 母义明, 等. 脂肪酸对 HepG2 肝细胞脂联素受体表达的影响 [J]. 北京医学, 2005, 27(5): 289–290.
- [14] 骆新. 维药昆仑雪菊对 2 型糖尿病大鼠的影响 [D]. 新疆医科大学, 2009.
- [15] Kanno T, Matsuki T, Oka M, et al. Gastric acid reduction leads to an alteration in lower intestinal microflora [J]. Biochem Biophys Res Comm, 2009, 381(4): 666–670.
- [16] 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.
- [17] Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity [J]. Nature, 2006, 444(7122): 1022–1023.
- [18] Xu J, Bjursell MK, Himrod J, et al. A genomic view of the human-Bacteroides thetaiotaomicron symbiosis [J]. Science, 2003, 299(5615): 2074–2076.
- [19] 张丽萍, 王康宁. 多形拟杆菌与宿主营养物质的利用 [J]. 中国畜牧杂志, 2009, 9(5): 57–61.
- [20] 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(2): e9085.
- [21] 谢婧雯, 王焱, 朱明, 等. 多形拟杆菌对糖尿病模型小鼠的影响 [J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(8): 869–873.
- [22] 张燕, 李琳琳, 木合布力·阿布力孜, 等. 新疆昆仑雪菊 5 种提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 166–169.
- [23] 方瑞萍, 唐辉, 黄剑, 等. 雪菊的药理作用及营养成分的分析方法研究进展 [J]. 材料导报, 2014, 28(19): 143–146.
- [24] 张淑鹏, 李琳琳, 木合布力·阿布力孜, 等. 昆仑雪菊提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用 [J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(6): 1055–1058.

[收稿日期] 2015–06–16