

## 桑枝多糖通过调节肠道菌群降血糖的作用研究

潘勇, 黄永毅, 徐灵源, 覃艳春, 梁玲玲, 王露瑶, 黄衍强

(右江民族医学院耐药微生物感染防治研究中心, 广西 百色 533000)

**摘要:**目的 探讨桑枝多糖(RMP)降血糖的机制。方法 构建糖尿病小鼠模型,将模型小鼠分磷酸缓冲盐溶液(PBS)、RMP、二甲双胍(MF)治疗组,并设未造模的正常对照组;治疗后检测小鼠血糖、粪便和回肠内容物16SRNA、肠道菌群等。结果 正常组(Normal)、PBS组、RMP组、MF组的平均血糖分别为5.4 mmol/L、13.2 mmol/L、5.6 mmol/L、5.8 mmol/L,PBS组血糖明显高于正常对照组、RMP组和MF组( $P < 0.05$ );在小鼠粪便和回肠内容物中,PBS组、RMP组及MF组16SRNA百分比分别为86.86%/80.00%、120.43%/125.11%、109.00%/112.86%,RMP组和MF组的16SRNA明显高于PBS组( $P < 0.05$ );RMP组、MF组与PBS组比较双歧杆菌属、肠球菌属、乳杆菌属、链球菌属、葡萄球菌属占比较高。结论 桑枝多糖降低糖尿病小鼠血糖与调节肠道菌群的结构有密切的关系。

**关键词:**桑枝多糖;肠道菌群;血糖;糖尿病

中图分类号:R587.1

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2020)01-0007-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2020.01.002

### The effect of *Ramulus mori* polysaccharides on down-regulation of blood glucose by mediating intestinal flora

Pan Yong, Huang Yongyi, Xu Lingyuan, Qin Yanchun, Liang Lingling, Wang Luyao, Huang Yanqiang

(Research Center for the Prevention and Treatment of Drug-resistant Microbial Infection, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the mechanism of *Ramulus mori* polysaccharides (RMP) in down-regulation of blood glucose. **Methods** The diabetic mouse models were established, and the model mice were divided into a PBS group, a RMP group and a Metformin (MF) group. The non-model mice were enrolled in the normal control group. The blood glucose, 16SRNA in fecal and ileum contents, intestinal flora were detected after treatment. **Results** Among the normal group, PBS group, RMP group and MF group: the mean blood glucose was 5.4 mmol/L, 13.2 mmol/L, 5.6 mmol/L and 5.8 mmol/L, respectively; PBS group had obviously higher blood glucose than normal control group, RMP group and MF group ( $P < 0.05$ ). The percentage of 16SRNA in mice feces and ileum of PBS group, RMP group and MF group were 86.86%/80.00%, 120.43%/125.11%, 109.00%/112.86%, respectively; RMP group and MF group had significantly higher 16SRNA than PBS group ( $P < 0.05$ ). The percentages of bifidobacteria, Enterococcus, Lactobacillus, Streptococcus and Staphylococcus were higher in RMP group and MF group than those in PBS group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The effect of *Ramulus mori* polysaccharides on down-regulation of blood glucose in diabetic mice has close relationship with regulating the structure of intestinal flora.

**Key words:** *Ramulus mori* polysaccharides; intestinal flora; blood glucose; diabetes mellitus

基金项目:国家自然科学基金(31460023)

第一作者简介:潘勇(1978-),男,讲师,研究方向:中药的医药作用筛选,E-mail:285806805@qq.com

通讯作者简介:黄衍强(1977-),男,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:肠道菌群的致病作用,E-mail:hyq77615@163.com

糖尿病是一种慢性糖代谢障碍的疾病,以高血糖为特征,分为 I 型糖尿病和 II 型糖尿病,其中 II 型较为常见,发病机制主要为自身免疫破坏的胰岛功能敏感性不足或缺陷导致的胰岛素抵抗<sup>[1-2]</sup>。以胰岛素不足为特征的胰腺功能低下,糖尿病患者可能会随着时间的推移遭受威胁生命的合并症。可见,纠正高血糖或低胰岛素血症是预防和治疗糖尿病的有效策略。目前,临床上用于糖尿病治疗的药物已经取得了一些成功,特别是口服降糖药二甲双胍(MF)等,但是糖尿病还是未能得到有效的控制,药物的依赖性、耐药性等问题逐渐凸显<sup>[3-4]</sup>。天然药物具有一定的降血糖作用,而且部分天然药具有恢复胰岛素功能,是控制高血糖的良好药物<sup>[5-6]</sup>。我们前期研究发现桑枝多糖具有较好的降血糖作用,但是其作用机制尚未完全清楚<sup>[7]</sup>,因此本文从桑枝多糖调节肠道菌群层面研究其降糖机制,具体如下:

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 雌性 SPF 级 C57BL/6 小鼠,6~8 周龄,体重 18~20 g,共 30 只,购于南京医科大学实验动物中心,动物许可证号:生产许可(苏)2016-002。适应性饲养 1 周后,开展实验。

1.2 化学制品和试剂 链脲佐菌素 STZ(Sigma, USA)、盐酸二甲双胍片(MF、北京京丰制药集团有限公司)、血糖测试条(罗氏活力型血糖仪配套)、粪便 DNA 提取试剂盒(天根)、Q-PCR 试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司)。

### 1.3 方法

1.3.1 桑枝多糖提取 按照课题组前面的提取方法<sup>[7]</sup>,主要步骤是石油醚脱脂,水煮,氯仿-正丁醇去除蛋白质,乙醇、乙醚、丙酮提取多糖,色谱系统纯化,GC-201 系列色谱系统(日本岛津)检测桑枝多糖(RMP)纯度,纯度为 85.2%。

1.3.2 建立 STZ 糖尿病小鼠模型 适应性喂养 7 d 后,给小鼠腹腔内注射 STZ 缓冲溶液(150 mg/kg)。在 72 h 后从禁食处理过的小鼠中提取尾静脉血样品 100  $\mu$ l。小鼠的空腹血糖(FBG)值高于 11.1 mmol/L 为糖尿病造模成功小鼠。将 STZ 糖尿病小鼠分为不同的组:磷酸缓冲盐溶液(PBS)治疗对照组,RMP 治疗组和 MF 治疗组,每组 7 只小鼠。PBS 组小鼠灌胃 PBS,RMP 组小鼠灌胃 RMP 600 mg/kg  $\cdot$  d<sup>-1</sup>,MF 组小鼠灌胃 MF 600 mg/kg  $\cdot$  d<sup>-1</sup>,正常对照组灌胃等量生理盐水,连续灌胃 2 周。

1.3.3 标本采集 给药后 2 周,小鼠禁食 12 h 的断尾取血测定空腹血糖值,并采集小鼠粪便及回肠内容物检测肠道菌群。

1.3.4 肠道内容物细菌总 16SRNA 检测 ①

16SRNA 提取按照试剂盒说明书进行(TIANGEN DP121221);引物为:5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-TAA-3' 和 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'。  
②实验方法和反应参照参考文献<sup>[8]</sup>,20  $\mu$ l 体系(SYBR 10  $\mu$ l,Primer 0.4  $\mu$ l,DNA 1  $\mu$ l,ddH<sub>2</sub>O 8.2  $\mu$ l),第一步 95 $^{\circ}$ C,300 Sec,第二步 95 $^{\circ}$ C,10 Sec,60 $^{\circ}$ C,30 Sec,40 个循环。

1.3.5 小鼠粪便肠道菌群检测 小鼠粪便肠道菌群检测送华大基因有限公司完成,基于物种注释结果和 OTU 进行样品组间物种差异分析及物种复杂度分析。

1.4 统计学方法 所有数据经 SPSS 20.0 统计软件和 Graphpad Prism 5.0 软件进行统计和图制作,实验结果均以( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组之间比较采用单因素方差分析,两组之间比较采用 LSD-*t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 实验结果

2.1 小鼠血糖 经造模后筛选空腹血糖值高于 11.1 mmol/L 归类为糖尿病小鼠,共筛选出 21 只糖尿病小鼠,把小鼠平均分为糖尿病造模小鼠非治疗组(PBS 组)、桑枝多糖治疗组(RMP 组)、二甲双胍治疗组(MF 组)。经治疗后,正常组(Normal)、PBS 组、RMP 组、MF 组的平均血糖分别为 5.4 mmol/L、13.2 mmol/L、5.6 mmol/L、5.8 mmol/L,RMP 组和 MF 组血糖明显降低,与 PBS 组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见图 1。

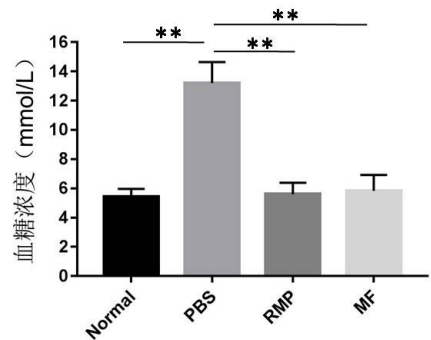


图 1 各组小鼠的血糖浓度比较

注:Normal:正常小鼠组;PBS:糖尿病造模小鼠 PBS 治疗组;RMP:桑枝多糖治疗组;MF:二甲双胍治疗组;\*\*为  $P < 0.01$

2.2 小鼠肠道菌群总 16SRNA 对小鼠肠道粪便和回肠内容物检测发现,PBS 组、RMP 组、MF 组相对正常组小组的 16SRNA 百分比分别为 86.86%/80.00%、120.43%/125.11%、109.00%/112.86%;PBS 组菌群总量减少,RMP 组和 MF 组菌群总量增

加,PBS 组与正常组没有显著差异,但是 RMP 组和 MF 组与 PBS 组对比,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见图 2。

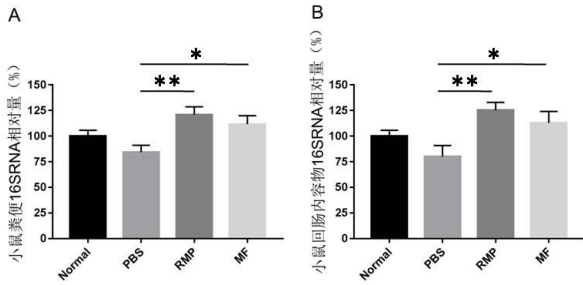


图 2 小鼠粪便和回肠内容物肠道菌群 16SRNA 量变化  
注:Normal:正常小鼠组;PBS:糖尿病造模小鼠 PBS 治疗组;RMP:桑枝多糖治疗组;MF:二甲双胍治疗组;每组 7 只小鼠;  
\* 为  $P < 0.05$ , \*\* 为  $P < 0.01$

2.3 小鼠粪便肠道菌群变化 对小鼠粪便肠道菌群检测发现,糖尿病造模 PBS 治疗组在门水平中拟杆菌门、变形菌门明显升高,厚壁门明显降低(见图 3A);在科水平中肠杆菌科和类杆菌科明显升高,双歧杆菌科、肠球菌科、乳杆菌科、链球菌科明显降低(见图 3B);在属水平中志贺氏菌属、大肠杆菌属、变形杆菌属、克雷伯菌属明显升高,双歧杆菌属、肠球菌属、乳杆菌属、链球菌属、葡萄球菌属明显降低(见图 3C)。RMP 组和 MF 组无明显差异,但相对 PBS 组,在属水平中志贺氏菌属、变形杆菌属、克雷伯菌属明显降低,双歧杆菌属、肠球菌属、乳杆菌属、链球菌属、葡萄球菌属明显升高;而且 RMP 组和 MF 组菌群多样性程度更高(见图 3D)。

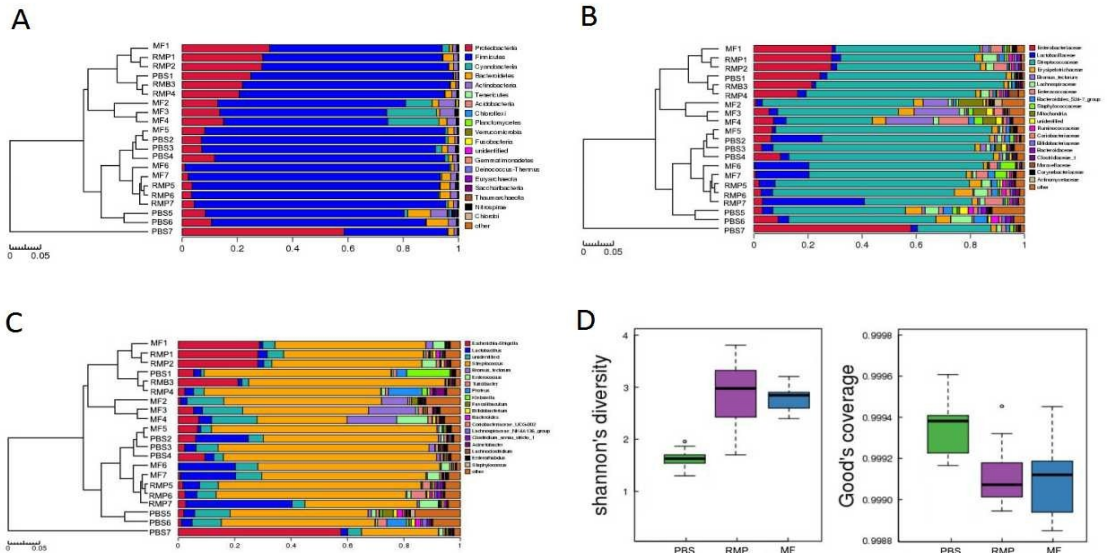


图 3 小鼠粪便肠道菌群变化

注:A. 门水平;B. 科水平;C. 属水平;D. 多样性变化;PBS:糖尿病造模小鼠 PBS 治疗组;RMP:桑枝多糖治疗组;MF:二甲双胍治疗组;每组 7 只小鼠

### 3 讨论

糖尿病是一种机体胰岛素分泌不足或利用缺陷而发生的一种慢性病,常见的是 II 型糖尿病,主要影响因素包括种族、年龄、体重、肥胖、生活方式等<sup>[9-10]</sup>。近年研究发现肠道菌群与 II 型糖尿病有密切相关,肠道菌群失调影响宿主能量代谢、炎症反应,调节肠道菌群可以改善糖代谢和胰岛素抵抗,提高胰岛素的敏感性<sup>[11-12]</sup>。桑枝是民间常用中草药,《本草图经》记载:“桑枝疗遍体风痒干燥,兼疗口干”,现临床上主要用于治疗肩臂关节及手足酸痛麻木、风湿痹痛、瘫痪等多种疾病。我们的前期研究及其它课题组的研究也都发现桑枝的主要成分桑枝多糖具有降低血糖,提高胰岛素

敏感性的作用,但是其机制尚未清楚<sup>[7,13-14]</sup>。部分植物多糖可以作为益生元对肠道菌群的组成结构进行调节,产生的代谢产物影响菌群之间的相互作用,再进一步影响宿主健康<sup>[15-16]</sup>,桑枝多糖是否也是通过对肠道菌群的调节发挥降糖作用尚未见报道。

本研究在糖尿病小鼠造模成功后分别用 PBS、RMP 和 MF 进行治疗,RMP 和 MF 均能降低血糖,两者没有显著差异;检测肠道粪便及回肠内容物 16SRNA 总量和肠道菌群的变化,PBS 治疗组 16SRNA 总量减少,在属水平中志贺氏菌属、大肠杆菌属、变形杆菌属、克雷伯菌属明显升高,双歧杆菌属、肠球菌属、乳杆菌属、链球菌属、葡萄球菌属明显降低,在

科和门水平中也有对应一致的变化;RMP组和MF组无明显差异,但相对PBS组,检测结果刚好相反,说明RMP组和MF组能通过降低志贺氏菌、大肠杆菌、变形杆菌、克雷伯菌,升高双歧杆菌、肠球菌、乳杆菌、链球菌、葡萄球菌,从而调节肠道菌群结构,达到降低血糖的作用。肠道菌群变化可能还涉及其它菌群,因本研究的小鼠数量较少,可能检测出来的并不够全面;另外本文涉及的肠道菌群代谢产物是否影响了血糖的变化尚需进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] Aschner P, Chan J, Owens DR, et al. Insulin glargine versus sitagliptin in insulin-naive patients with type 2 diabetes mellitus uncontrolled on motormen (EASIE): A multicentre, randomised open-label trial[J]. *Lancet*, 2012, 379(9833):2262-2269.
- [2] Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045 [J]. *Diabetes research and clinical practice*, 2018, 138:271-281.
- [3] Xu P, Hong F, Wang J, et al. Microbiome Remodeling via the Montmorillonite Adsorption-Excretion Axis Prevents Obesity-related Metabolic Disorders[J]. *EBioMedicine*, 2017, 16:251-261.
- [4] 汪会琴,胡如英,武海滨,等. 2型糖尿病报告发病率研究进展 [J]. *浙江预防医学*, 2016(1):37-39, 57.
- [5] 陈玲玲,张思为,李董平,等. 薏苡附子败酱散对糖尿病小鼠炎症因子及肠道菌群的影响[J]. *陕西中医*, 2018, 39(4):415-418.
- [6] 章常华,马广强,邓永兵,等. 葛根芩连汤对 KK-Ay 糖尿病小鼠血浆中 LPS、TNF- $\alpha$ 、IL-6 及肠道菌群的影响[J].

中草药, 2017, 48(8):1611-1616.

- [7] Xu L, Yang F, Wang J, et al. Anti-diabetic effect mediated by *Ramulus mori* polysaccharides[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 117:63-69.
- [8] 袁瑜,孙之梅,张扬,等. 肠道微生态对非酒精性脂肪性肝病发病与治疗的影响[J]. *中华肝病杂志*, 2016, 24(5):375-379.
- [9] 王琳,冯波. 肠道——糖尿病防治不可忽视的靶器官[J]. *内科急危重症杂志*, 2015, 21(4):256-258.
- [10] Ahmadi S, Nagpal R, Wang S, et al. Prebiotics from a-corn and sago prevent high-fat-diet-induced insulin resistance via microbiome gut-brain axis modulation [J]. *The Journal of nutritional biochemistry*, 2019, 67:1-13.
- [11] Lim MY, You HJ, Yoon HS, et al. The effect of heritability and host genetics on the gut microbiota and metabolic syndrome[J]. *Gut*, 2017, 66(6):1031-1038.
- [12] Sedighi M, Razavi S, Navab - Moghadam F, et al. Comparison of gut microbiota in adult patients with type 2 diabetes and healthy individuals [J]. *Microb Pathog*, 2017, 111:362-369.
- [13] 洪德志,时连根. 桑枝多糖对糖尿病模型小鼠的降血糖作用[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2012, 26(6):806-809.
- [14] 郭福团,许雄伟,潘建峰,等. 桑枝多糖对糖尿病肾病大鼠肾脏组织抗氧化作用的影响[J]. *中国医院药学杂志*, 2016, 36(23):2058-2061.
- [15] 赵丹莉,谢明杰. 高通量测序技术分析壳寡糖对小鼠肠道菌群的影响[J]. *营养学报*, 2018, 40(5):449-453.
- [16] 崔芳,史春丽,尹梅,等. 枸杞多糖对过敏性哮喘小鼠肠道菌群的影响[J]. *现代食品科技*, 2019, 35(9):67-73.

收稿日期:2019-12-21;修回日期:2020-01-03

## 本刊关于论著类文章的界定说明

论著是相对于综述、讲座、短篇报道等而言的一种文体类型。目前国内尚无统一的界定标准和方法。本刊论著是指科研论文中,符合国际通用的温哥华论文格式,全文由中英文摘要、前言、材料与方法、结果、讨论及参考文献组成,中英文摘要为结构式摘要,包括目的、方法、结果、结论四要素。凡符合上述条件的论文,本刊皆界定为论著,特此声明。

《右江民族医学院学报》编辑部

2020年1月