

洪雪珮, 庞书勤, 葛莉, 等. 薯蓣粥对 2 型糖尿病大鼠肠道通透性的影响 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(4): 379–386. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060096

HONG Xuepei, PANG Shuqin, GE Li, et al. Effect of Yam Gruel on Intestinal Permeability of Type 2 Diabetic Rats[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(4): 379–386. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060096

· 营养与保健 ·

薯蓣粥对 2 型糖尿病大鼠肠道通透性的影响

洪雪珮, 庞书勤*, 葛莉, 戴燕铃, 林心君, 李霞, 吴异兰, 王冠明, 张佳惠
(福建中医药大学护理学院, 福建福州 350122)

摘要:目的: 探讨薯蓣粥对 2 型糖尿病 (Type 2 diabetes mellitus, T2DM) 大鼠肠道通透性的影响。方法: 将 35 只雄性 Wistar 随机分为空白组 8 只和造模组 27 只。空白组大鼠饲喂普通饲料, 造模组使用高脂喂养加腹部注射链脲佐菌素法制备 T2DM 大鼠模型, 成模后大鼠随机分为模型组、薯蓣粥组、二甲双胍组; 空白组、模型组每日以生理盐水灌胃 5 mL, 薯蓣粥组每日以薯蓣粥灌胃 5 mL, 二甲双胍组每日以二甲双胍水溶液灌胃 5 mL, 共 6 周; 每周检测大鼠空腹血糖 (Fasting Blood Glucose, FBG), 干预后观察各组大鼠结肠组织学形态, 检测结肠组织的炎症因子肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-6 (Interleukin-6, IL-6), 和紧密连接蛋白 Occludin、ZO-1 的表达; 以及血清连蛋白 (Zonulin)、内毒素 (Lipopolysaccharide, LPS) 水平; 血清 TNF- α 、IL-6、空腹胰岛素 (Fasting insulin, FINS) 水平, 计算胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR)。结果: 模型组大鼠的肠绒毛断裂不全且间隔稀疏, 同时伴有中性粒细胞渗出, 薯蓣粥组、二甲双胍组大鼠的上述情况优于模型组。与空白组相比, 模型组大鼠结肠 TNF- α 、IL-6 蛋白表达增加 ($P<0.05$), Occludin、ZO-1 蛋白表达减少 ($P<0.05$), 血清中 Zonulin、LPS、TNF- α 、IL-6、FINS 水平上升 ($P<0.05$), FBG、HOMA-IR 升高 ($P<0.05$); 与模型组相比, 薯蓣粥组大鼠结肠 TNF- α 、IL-6 蛋白表达减少 ($P<0.05$), Occludin、ZO-1 蛋白表达增加 ($P<0.05$); 血清中 Zonulin、LPS、TNF- α 、IL-6、FINS 水平下降 ($P<0.05$), FBG、HOMA-IR 下降 ($P<0.05$)。结论: 薯蓣粥能够降低 T2DM 大鼠肠道通透性, 进而达到减轻全身炎症反应, 缓解胰岛素抵抗、改善血糖代谢的效果。

关键词: 薯蓣粥, 2 型糖尿病, 肠道通透性, 炎症反应, 胰岛素抵抗

中图分类号: R587.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)04-0379-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060096

本文网刊:



Effect of Yam Gruel on Intestinal Permeability of Type 2 Diabetic Rats

HONG Xuepei, PANG Shuqin*, GE Li, DAI Yanling, LIN Xinjun, LI Xia, WU Yilan,
WANG Guanming, ZHANG Jiahui

(School of Nursing, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

Abstract: Objective: To explore the effect of yam gruel on intestinal permeability in T2DM rats. Methods: 35 male Wistar rats were randomly divided into blank group (n=8) and model group (n=27). The rats in the blank group were given normal diet, and the model group were fed with high-fat diet and intraperitoneal injection of streptozotocin to prepare T2DM rat model. After modeling, the rats were randomly divided into model group, yam gruel group and metformin group. The blank group and model group were given 5 mL normal saline, the yam gruel group was given 5 mL yam gruel, and the metformin group was given 5 mL metformin. Fasting blood glucose (FBG) was measured every week. After the intervention, the histological morphology of colon was observed, and the protein expressions of TNF- α , IL-6, Occludin and ZO-1 in colon tissue, and the expression of Zonulin, LPS, TNF- α , IL-6 and fins in serum were detected. HOMA-IR was calculated. Results: In the model group, the intestinal villi were incomplete and sparsely spaced, accompanied by neutrophil exudation. The above situation in yam gruel group and metformin group was better than that in the model group. In the model group, the protein expression of TNF- α and IL-6 increased ($P<0.05$), the protein expression of Occludin and ZO-1 decreased

收稿日期: 2021-06-10

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81904269); 福建省自然科学基金项目 (2019J01358)。

作者简介: 洪雪珮 (1995-), 女, 硕士, 研究方向: 老年护理, E-mail: 421429060@qq.com。

* 通信作者: 庞书勤 (1962-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 老年护理, E-mail: pang-shuqin@fjtcu.edu.cn。

($P<0.05$), the expression of Zonulin, LPS, TNF- α , IL-6 and FINS increased ($P<0.05$), FBG and HOMA-IR increased ($P<0.05$). In the yam gruel group, the protein expression of TNF- α and IL-6 decreased ($P<0.05$), the protein expression of Occludin and ZO-1 increased ($P<0.05$), the expression of Zonulin, LPS, TNF- α , IL-6 and FINS decreased ($P<0.05$), FBG and HOMA-IR decreased ($P<0.05$). Conclusion: Yam gruel could reduce the intestinal permeability of T2DM rats, and then reduce the systemic inflammatory response, alleviate insulin resistance and improve blood glucose.

Key words: yam gruel; type 2 diabetes; intestinal permea; inflammatory response; insulin resistance

2型糖尿病(Type 2 diabetes mellitus, T2DM)是一种慢性疾病,胰岛素抵抗(Insulin resistance, IR)是T2DM的发生、发展的关键问题^[1-2]。伴随着检测技术的不断进步,诸多研究不断揭示T2DM的发生发展与肠道菌群密切相关:肠道是体内的储菌库,T2DM伴发肠道菌群紊乱,具体表现为有害菌增多,益生菌减少,这将引发肠黏膜炎症反应,破坏肠道屏障结构和功能,使肠道通透性增加,肠道内大量的有害菌、毒素经被破坏的肠道屏障进入全身各组织,大量激活全身促炎因子释放(如TNF- α 、IL-6等),诱发或加重机体的炎症反应,这些被大量释放的促炎因子能够破坏胰岛 β 细胞、干扰胰岛素的信号传导,加重胰岛素抵抗^[3-6]。国内外研究显示,益生菌及其发酵合成的短链脂肪酸(Short-chain fatty acids, SCFAs)具有降低肠道炎症反应、修复肠上皮屏障的作用,能够增加肠上皮细胞紧密连接蛋白的表达,修复受损的肠道屏障^[7-8]。薯蓣粥出自张锡纯的著作《医学衷中参西录》,是一味经典的中医食疗方,课题组前期研究发现:薯蓣粥能够促进T2DM患者肠道内双歧杆菌生长,促进T2DM大鼠肠道内阿克曼氏菌、梭菌等益生菌的生长,改善肠道菌群紊乱、增加SCFAs含量^[9-10],由此推测薯蓣粥在调节T2DM大鼠肠道菌群、增加SCFAs的基础上,可望减轻T2DM大鼠肠道炎症反应,增加肠上皮紧密连接蛋白的表达,降低肠道通透性,下调全身炎症反应,改善胰岛素抵抗、降低血糖。本研究建立T2DM大鼠模型,通过观察各组大鼠相关指标变化,探讨薯蓣粥对T2DM大鼠肠道通透性的影响,以期对薯蓣粥的再续性研究及推广应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

35只SPF级雄性Wistar大鼠(8周龄) 上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物许可证号:SCXK(沪)2012-0011,体重(180 $\pm$ 10)g,在某大学动物中心清洁级动物房内饲养(伦理批号:2019-33);高脂饲料 闽侯实验动物贸易有限公司(中国福州);生铁棍山药 福州市闽侯县上街致诚医药商店;二甲双胍片 格华止,0.85g/片,国药准字:H20023371;链脲佐菌素(STZ) Sigma公司;血糖试纸 福州贝尔曼生物科技有限公司;大鼠胰岛素(INS)、连蛋白酶联免疫分析试剂盒 酶联生物科技有限公司;大鼠白介素-6、肿瘤坏死因子- α 、内毒素酶联免疫分析试剂盒 南京建成生物科技有限公司;浓缩型正常山羊血清、

荧光(DyLight 488)标记羊抗兔IgG、即用型SABC-POD(兔IgG)试剂盒、大鼠白介素-6抗体、肿瘤坏死因子- α 抗体、内源性过氧化物酶阻断剂、EDTA抗原修复液(10 $\times$)、抗体稀释液、PBS漂洗液 武汉博士德生物科技有限公司。

Contour TS拜安康血糖仪 德国拜耳公司; ELX808型酶联免疫检测仪 美国BIO-TEK公司; BX51显微镜 日本奥林巴斯株式会社; TGL-16B型台式高速离心机 上海安亭科学仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 灌胃溶液的制备 薯蓣粥:实验所需山药在指定商家购买,每日制作薯蓣粥。山药去皮后称重125g,切片、入匀浆机,加水50mL打成糊,250mL凉水调入,中火加热至煮沸,维持30s后再文火加热30s,中火30s-文火30s连煮3次,过程中不中断地轻轻搅拌,最后成粥状,浓度为0.5g/mL,冷却至37℃使用。根据体表面积计算方法^[11]得出:每只大鼠的灌胃量是20mL/kg·d。本实验用的T2DM大鼠体重为250~300g,计算出灌胃剂量为5~6mL。课题组前期实验发现,每只大鼠每次灌胃5mL时大鼠不易死亡^[10],因此每只大鼠每日灌胃5mL薯蓣粥,其中的山药含量为5mL/d $\times$ 0.5g/mL=2.5g/d。二甲双胍水溶液:依据文献^[11]换算得出,每只大鼠每日需100mg/kg二甲双胍,根据大鼠体重计算出每日所需的二甲双胍药量,将所需二甲双胍药物研磨成粉,融入5mL生理盐水,现配现用。

1.2.2 造模 将35只雄性Wistar大鼠称重、编号,使用随机数字表发随机分为空白组(8只),造模组(27只)。造模组以高脂饲料喂养6周,参照施红团队的高脂高糖饲料联合腹部小剂量注射1%STZ溶液法进行T2DM大鼠造模^[12]。空白组大鼠以普通饲料喂养6周,造模日在腹腔注射等容积的柠檬酸钠缓冲液。造模72h后经尾静脉采血测量空腹血糖(Fasting blood glucose, FBG),以FBG>11.1mmol/L判断造模情况。本次27只大鼠进行造模,成功23只,成模率为85%。

1.2.3 分组与干预 本次造模共成模23只大鼠,使用随机数字表法进行分组如下:模型组8只,薯蓣粥组7只,二甲双胍组8只。干预方法:空白组和模型组每日以5mL生理盐水灌胃,薯蓣粥组大鼠每日以5mL薯蓣粥灌胃,二甲双胍组每日以5mL二甲双胍溶液灌胃。所有大鼠在灌胃期间正常饮水,喂养普通饲料,共干预6周。

1.2.4 指标检测 干预期间每周检测空腹血糖, 干预结束后, 所有大鼠使用 2% 戊巴比妥钠腹腔麻醉注射, 抽取腹主动脉血 2 mL, 取 1 cm 的结肠组织两份, 将每份结肠组织份用 4℃ 磷酸盐缓冲液冰上漂洗 3 遍, 再用无菌滤纸吸干, 放入 15 mL 4% 多聚甲醛溶液的 EP 管内固定, 后进行石蜡包埋。选取指标及对应检测方法如下:

1.2.4.1 结肠组织病理学变化 用 HE 染色法观察结肠组织病理学变化。将石蜡组织块切片、烘烤 30 min(60℃), 放入二甲苯溶液中脱蜡, 再将切片依次放入浓度呈梯度下降的酒精、蒸馏水中。切片经梯度下降的酒精-蒸馏水洗涤后, 移入苏木精溶液中浸泡, 然后在用蒸馏水中洗去残余的染色液。用 1% 的盐酸酒精分化 30 s, 随后在蒸馏水中放置约 5 min 洗净。将染色后的切片依次放入浓度呈梯度升高的酒精及二甲苯溶液中, 取出后滴树胶、封片, 待切片干燥后在电子显微镜下观测结肠组织的病理表现并拍照记录^[13]。

1.2.4.2 结肠 TNF- α 、IL-6 蛋白表达 使用免疫组织化学法监测结肠 TNF- α 、IL-6 蛋白表达。将包埋好的蜡块送至福州沃森生物科技有限公司进行检查。结果观察方法^[14]: a. 在透射电镜下直接观察切片情况, TNF- α 与 IL-6 均染色在细胞质, 阳性染色为黄褐色, 黄褐色面积越多、颜色越深说明该蛋白的表达越高; b. 使用 Image J 软件计算样本的强染色、中度染色、弱染色、阴性染色的面积(%), 使用组织化学评分(histochemistry score, H-Score)进行计算: H-Score 评分=1×弱染色面积(%) + 2×中度染色(%) + 3×强染色(%), 评分越高说明该蛋白的表达量越高。

1.2.4.3 结肠组织 Occludin、ZO-1 蛋白表达 使用免疫荧光组织化学法监测结肠 Occludin、ZO-1 蛋白表达, 将包埋好的蜡块送至福州沃森生物科技有限公司进行检查。结果观察方法^[14]: a. 在共聚焦显微镜下观察切片情况, Occludin 与 ZO-1 的阳性染色为荧光绿色, 荧光绿色面积越多、颜色越深, 说明该蛋白的表达越高; b. 使用 Image J 软件计算样本的平均荧光强度, 荧光强度越高, 说明该蛋白的表达量越高。

1.2.4.4 血清 Zonulin、LPS、TNF- α 、IL-6、FINS 取血后立即使用冰冻离心机离心(12000 r/m), 取上

清液冰冻保存(-80℃), 使用 ELISA 法监测上述指标, 操作步骤严格按照 ELISA 试剂盒上的说明进行。根据 FINS 和 FBG 计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR): 胰岛素抵抗指数=(空腹血糖×空腹胰岛素)/22.5。

1.3 数据处理

采用 SPSS20.0 软件进行统计分析, 计量资料符合正态分布时采用单因素方差分析, 否则用秩和检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 大鼠一般情况

本研究共纳入 8 只空白组大鼠, 23 只 T2DM 大鼠, 纳入的大鼠皆完成灌胃干预和样本采集, 无大鼠死亡。成模的 T2DM 大鼠出现倦怠、活动少、多饮、多食、多尿、粪便变稀等情况, 模型组大鼠的 FBG 极显著高于空白组($P<0.001$), 体重显著低于空白组($P<0.05$), 见表 1。空白组大鼠精神状态好, 活动多, 反应灵活, 毛发整洁, 光泽度好; 进食、饮水量均正常, 一般情况明显优于 T2DM 大鼠。本实验中的 T2DM 大鼠空腹血糖明显升高, 体重减轻, 还伴有糖尿病典型的“三多一少”症状, 说明本实验制造的 T2DM 大鼠模型符合 T2DM 的特点。

表 1 造模后大鼠血糖、体重比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of FBG and body weight of rats after modeling ($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	体重(g)	空腹血糖(mmol/L)
空白组	8	321.63 $\pm$ 10.01	5.76 $\pm$ 0.44
成模大鼠	23	304.30 $\pm$ 15.13 [*]	23.79 $\pm$ 4.51 [#]

注: *; 与空白组相比, $P<0.05$; #; 与空白组相比, $P<0.001$ 。

2.2 各组大鼠肠道通透性改变

2.2.1 各组大鼠结肠组织 HE 染色情况 由图 1 可知, 空白组大鼠的结肠黏膜组织未见明显异常损伤, 肠绒毛排列整齐, 连接完整; 模型组大鼠可观察到肠绒毛断裂不全且间隔稀疏, 同时伴有中性粒细胞渗出, 说明 T2DM 大鼠结肠组织受损, 可能存在炎症反应, 与其他研究结果一致^[13]; 本研究还发现, 与模型组相比, 薯蓣粥组、二甲双胍组大鼠的肠绒毛排列较为整齐, 完整性较好, 中性粒细胞渗出减少, 说明薯蓣

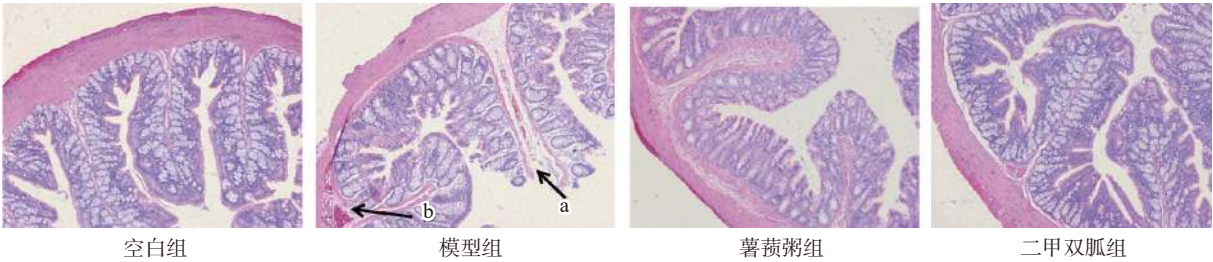


图 1 各组大鼠结肠组织 HE 染色结果(100×)

Fig.1 HE staining results of colon tissue of rats in each group (100×)
注: a: 肠绒毛断裂; b: 中性粒细胞渗出。

粥、二甲双胍均能在一定程度上缓解 T2DM 大鼠结肠组织的损伤情况。并且, 薯蓣粥组、二甲双胍组的 HE 染色切片在肉眼观察下没有明显差异。HE 监测只能提供结肠组织的大略受损情况, 可进一步进行更详尽的检测以明确不同干预手段对 T2DM 大鼠肠道通透性的影响。

2.2.2 各组大鼠结肠 TNF- α 、IL-6 的免疫组化结果分析 图 2 中, 模型组与空白组相比, TNF- α 、IL-6 蛋白染色的阳性区域多, 且颜色较深; 薯蓣粥干预后能减少 TNF- α 、IL-6 蛋白的阳性染色区域, 降低阳性染色的深度, 二甲双胍组与薯蓣粥组相比差异不明显。分析不同组大鼠的 H-Score 评分发现: 与空白组相比, 模型组大鼠的 TNF- α 、IL-6 表达水平升高 ($P<0.01$); 与模型组相比, 薯蓣粥组大鼠的 TNF- α 、IL-6 表达水平降低 ($P<0.01$), 而薯蓣粥组、二甲双胍组之间没有显著差异 ($P>0.05$), 见表 2。

表 2 各组大鼠结肠组织 TNF- α 、IL-6 的 H-Score 得分比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of H-score scores of TNF- α and IL-6 in colonic tissue of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	TNF- α	IL-6
空白组	0.22 $\pm$ 0.07	0.22 $\pm$ 0.04
模型组	0.52 $\pm$ 0.07*	0.73 $\pm$ 0.12*
薯蓣粥组	0.30 $\pm$ 0.07#	0.28 $\pm$ 0.06#
二甲双胍组	0.31 $\pm$ 0.05#	0.33 $\pm$ 0.04#

注: *: 与空白组相比, 模型组 $P<0.01$; #: 与模型组相比, 样品组 $P<0.01$; 表 3、表 6 同。

本研究发现: T2DM 模型组大鼠的结肠 TNF- α 、IL-6 蛋白含量明显升高, 提示 T2DM 大鼠结肠组织促炎因子升高, 存在炎症反应, 与其他研究结果一致^[15-16]; 高脂饮食诱导的 T2DM 大鼠出现肠道菌群失调, 产生内毒素^[15], 低水平的内毒素虽然无法引起明显的肠道感染, 但能够促进炎症因子 (如 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等) 分泌, 造成 T2DM 大鼠肠道炎症水平升高^[4,17]; 本研究中, 薯蓣粥能显著降低 T2DM 大鼠

结肠的 TNF- α 、IL-6 蛋白表达 ($P<0.01$), 说明薯蓣粥能够有效下调 T2DM 大鼠肠道炎症反应。有研究指出, SCFAs 是细菌的代谢产物, 主要包括乙酸、丙酸、丁酸, 丁酸能够下调高脂饲料喂养的载脂蛋白 E 基因敲除小鼠结肠组织中炎症因子 IL-1 β 水平, 说明丁酸能够下调肠道炎症反应^[18]。课题组前期研究中已经证实薯蓣粥能够增加 T2DM 大鼠 SCFAs 的含量^[10]。因此, 推测薯蓣粥可能通过增加 T2DM 肠道内 SCFAs 的表达, 下调结肠促炎因子表达, 降低肠道炎症。

2.2.3 各组大鼠结肠 ZO-1、Occludin 免疫荧光组织化学法结果分析 ZO-1、Occludin 定位于细胞膜, 阳性物质染色均为荧光绿色, 蓝色荧光为细胞核 DAPI 染色; Merge 是 DAPI 染色与目标蛋白阳性染色的结合 (ZO-1 染色结果见图 3; Occludin 染色结果见图 4)。图 3、图 4 中可见: 模型组大鼠的 Occludin、ZO-1 蛋白的荧光染色强度低于空白组, 阳性染色面积少于空白组, 且皆分布零星, 存在多处断裂, 连续性和完整性较差。与模型组相比, 薯蓣粥组大鼠结肠的 Occludin、ZO-1 蛋白荧光染色强度更高, 阳性染色面积更多, Occludin、ZO-1 蛋白分布的连续性和完整性较模型组有所改善。利用 Image J 软件计算平均荧光强度并进行数据分析: 模型组大鼠 Occludin、ZO-1 蛋白的平均荧光强度较空白组显著下降 ($P<0.01$); 薯蓣粥组、模型组大鼠 Occludin、ZO-1 蛋白的平均荧光强度均高于模型组 ($P<0.01$), 薯蓣粥组与二甲双胍组之间没有统计学差异 ($P>0.05$), 见表 3。

本研究发现, 与空白组相比, 模型组大鼠结肠组织 ZO-1、Occludin 蛋白表达均明显下降, 提示 T2DM 大鼠肠组织受损, 肠道紧密连接蛋白含量减少, 肠道通透性增加, 与其他研究结果一致^[19]; 有研究认为, T2DM 大鼠存在肠道炎症反应, 将导致炎症因子 (如 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等) 分泌增多, 这些炎症因子会破坏肠道紧密连接蛋白的表达和分布, 增加肠道通透性^[17], 本研究中 T2DM 大鼠结肠组织的炎症水平升

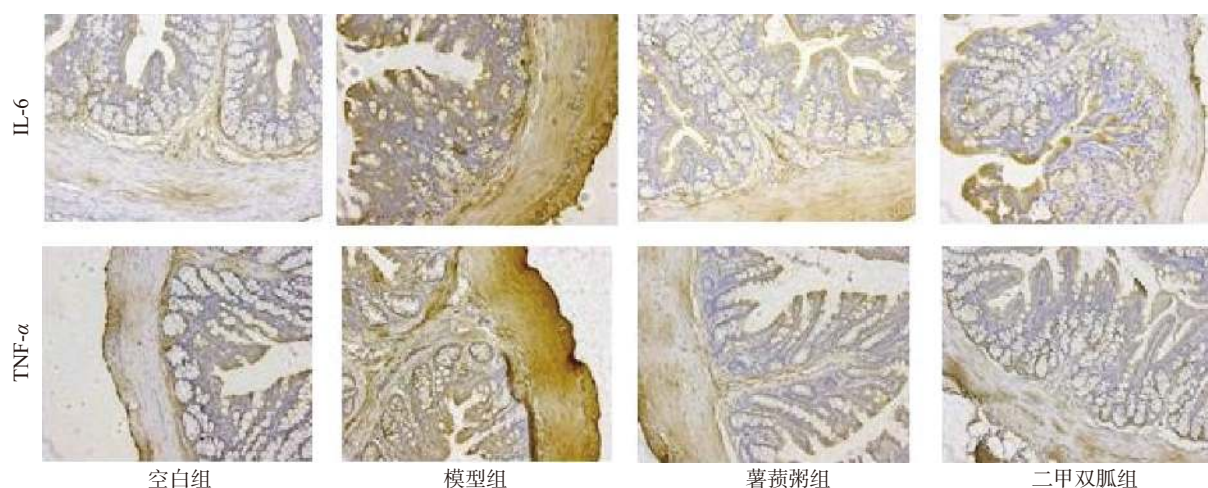


图 2 各组大鼠结肠组织 TNF- α 、IL-6 免疫组化染色结果 (100 $\times$)

Fig.2 Immunohistochemical staining results of TNF- α , IL-6 in colon tissue of rats in each group (100 $\times$)

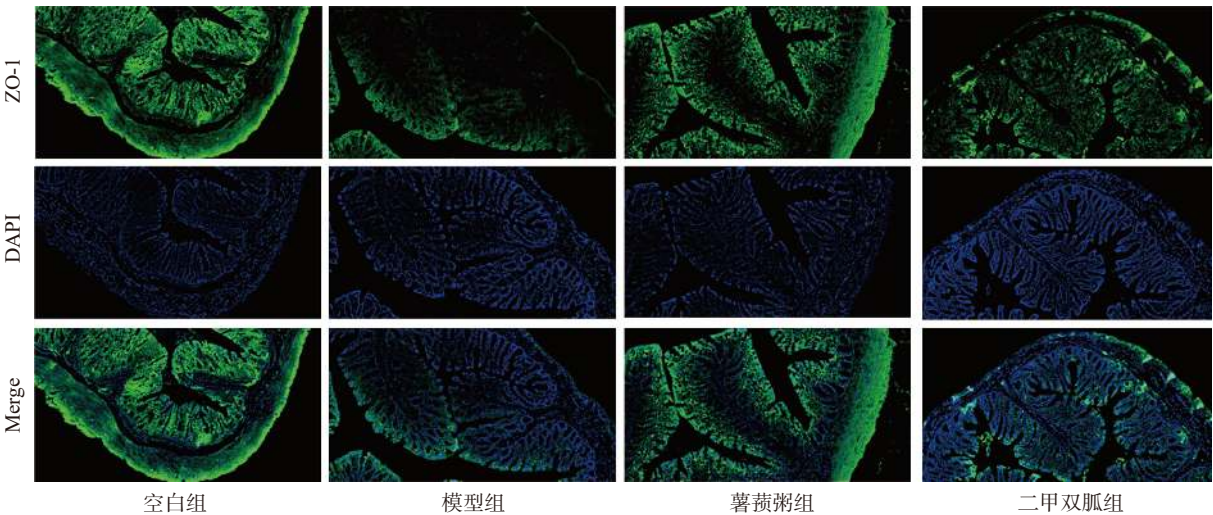


图 3 各组大鼠 ZO-1 蛋白比较(100×)

Fig.3 Comparison of ZO-1 of rats in each group during intervention (100×)

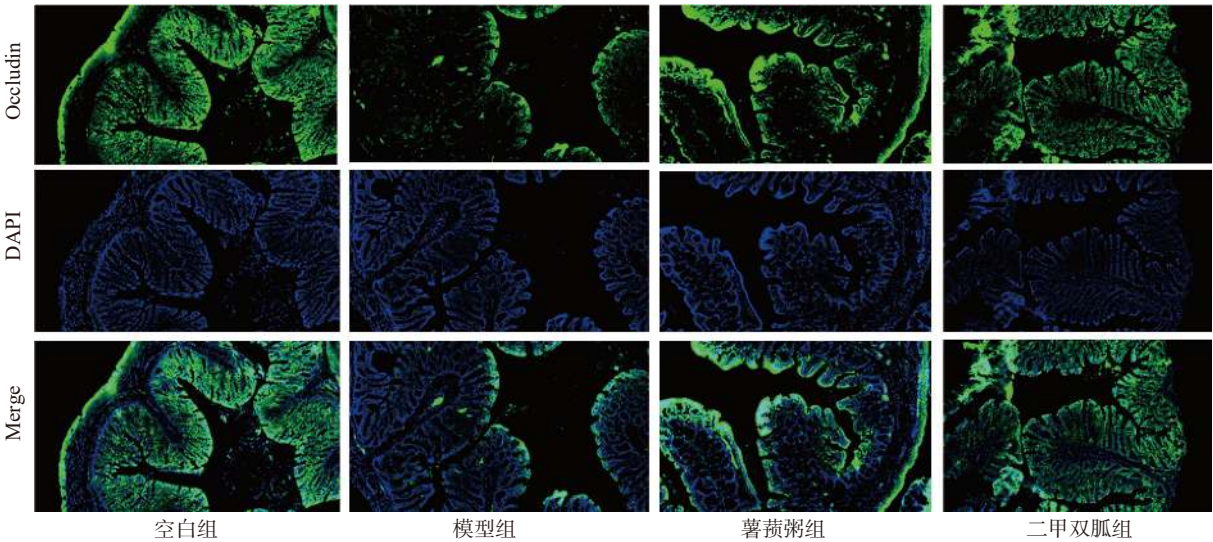


图 4 各组大鼠 Occludin 蛋白比较(100×)

Fig.4 Comparison of Occludin of rats in each group during intervention (100×)

表 3 各组大鼠结肠 ZO-1、Occludin 平均荧光强度值比较($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of the average fluorescence intensity of ZO-1 and Occludin in colon of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	ZO-1	Occludin
空白组	195.58±6.40	199.52±6.66
模型组	111.56±11.11 [*]	143.79±10.49 [*]
薯蓣粥组	159.17±9.79 [#]	171.47±13.16 [#]
二甲双胍组	157.27±11.01 [#]	167.78±10.79 [#]

高, 肠道紧密连接蛋白表达下降, 可以佐证这一观点。本研究还发现, 薯蓣粥能显著提高 T2DM 大鼠结肠组织 Occludin、ZO-1 蛋白表达($P<0.01$), 结合 2.2.2 可知: 薯蓣粥能够有效下调 T2DM 大鼠肠道炎症反应, 保护 T2DM 大鼠的肠道屏障, 降低肠道通透性。研究表明^[20]: 山药多糖 CYP-1 能够抑制结肠炎小鼠结肠 NF/κB 炎症信号通路的激活, 减轻肠道炎症, 进而增加紧密连接蛋白的基因表达, 表明山药中

的有效成分能够通过降低肠道炎症反应, 降低肠道通透性, 与本研究结果相符; 研究表明, 肠上皮细胞通过接收肠道微生物或入侵病原体的信号, 来调节肠黏膜屏障和免疫细胞, 适应肠道环境变化, 能够向肠上皮细胞传递信号的肠道微生物主要有细菌、和细菌的代谢产物^[21]。SCFAs 是细菌的代谢产物, 主要包括乙酸、丙酸、丁酸, 目前已被证实 SCFAs 在维持肠道屏障的完整性中发挥重要作用: 丁酸能够下调高脂饲料喂养的载脂蛋白 E 基因敲除小鼠结肠组织中炎症因子 IL-1β 水平, 增加紧密连接蛋白 Occludin、ZO-1 的表达, 说明丁酸能够调节肠道炎症反应, 降低肠道通透性^[18,22]。课题组前期研究中已经证实薯蓣粥能够增加 T2DM 大鼠 SCFAs 的含量^[10]。因此, 推测薯蓣粥可能通过增加 SCFAs, 下调结肠促炎因子表达, 降低肠道炎症, 保护肠道黏膜屏障, 降低肠道通透性。

2.2.4 各组大鼠血清 Zonulin、LPS、TNF-α、IL-6 水

平比较 与空白组相比,模型组大鼠血清 Zonulin、LPS、TNF- α 、IL-6 含量均升高($P<0.05$);与模型组相比,薯蓣粥组大鼠血清 Zonulin、LPS、TNF- α 、IL-6 含量均下降($P<0.05$),薯蓣粥组 IL-6 的含量低于二甲双胍组($P<0.05$),见表 4。当肠道通透性升高时,Zonulin 经肠组织进入血液,血液中的 Zonulin 水平可在一定程度上反映肠道损伤情况^[23-24]。LPS 是炎症刺激物,在肠道通透性升高时,能够通过损伤的肠道进入循环系统,诱导全身促炎因子释放,引起血液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量上升,诱发全身低度炎症反应^[13]。本研究发现,与空白组相比,模型组大鼠的血清 Zonulin、LPS、TNF- α 、IL-6 表达均升高($P<0.05$),说明在伴随着肠道通透性增加,T2DM 大鼠肠道中 Zonulin、LPS 被释放入血,引发机体产生全身低度炎症反应^[24]。机体在健康情况下,肠道屏障可以阻挡致病因素进入血液循环和其他器官,是机体抵抗病原微生物、各种毒素的第一道防线,而紧密连接蛋白是肠黏膜结构的重要组成部分,一旦发生变异、减少,都会导致肠道的屏障功能被破坏,肠道通透性增加,各种毒素、细菌、病原体将会跨越屏障,进入体循环,引发相应的疾病反应^[25]。

表 4 各组大鼠血清 Zonulin、LPS、TNF- α 、IL-6 比较($\bar{x}\pm s$)
Table 4 Comparison of serum Zonulin, LPS, TNF- α 、IL-6 of rats in each group during intervention ($\bar{x}\pm s$)

组别	Zonulin(ng/mL)	LPS(U/L)	TNF- α (pg/mL)	IL-6(pg/mL)
空白组	24.03 $\pm$ 3.42	26.60 $\pm$ 3.43	11.97 $\pm$ 3.61	8.88 $\pm$ 2.94
模型组	37.17 $\pm$ 7.68*	96.54 $\pm$ 14.94*	44.03 $\pm$ 5.68*	35.36 $\pm$ 3.43*
薯蓣粥组	23.47 $\pm$ 2.85#	37.45 $\pm$ 4.93#	24.06 $\pm$ 2.10#	13.78 $\pm$ 3.16#
二甲双胍组	22.29 $\pm$ 4.03#	40.62 $\pm$ 5.78#	25.72 $\pm$ 2.43#	19.34 $\pm$ 5.09# Δ

注:两两比较中,*与空白组相比, $P<0.05$;#与模型组相比, $P<0.05$ 。
 Δ :与薯蓣粥组相比, $P<0.05$ 。

本研究中发现,薯蓣粥能够下调 T2DM 大鼠血清 Zonulin、LPS、TNF- α 、IL-6 的表水平,并且薯蓣粥降低 T2DM 大鼠血清 IL-6 表达水平的效果优于二甲双胍组($P<0.05$),说明薯蓣粥能够降低 T2DM 大鼠的肠道通透性,缓解机体炎症水平。薯蓣粥对 T2DM 大鼠的抗炎作用可能与以下原因有关:a.山药中的有效成分具有缓解机体炎症水平的作用:薯蓣皂苷是山药的有效活性成分,它能够降低 T2DM 大鼠血清 TNF- α 、IL-6 水平^[26-27];b.薯蓣粥通过调节肠道微生物,发挥降低肠道通透性、缓解炎症反应的作用:薯蓣粥能够增加 T2DM 大鼠的 SCFAs 含量,上调肠道内 AKK 菌的相对丰度^[10],SCFAs 在多项研究中皆证明它具备调节肠道免疫功能,抑制炎症反应,从而降低肠道通透性,减低循环内毒素,缓解机体炎症反应^[28-29];AKK 菌能够改善高脂诱导的肥胖大鼠肠道屏障功能受损的情况,减轻代谢性内毒素血症,从而减轻由高脂饮食诱导的全身炎症反应^[30]。

2.3 各组大鼠 FINS、HOMA-IR 比较

与空白组相比,模型组大鼠 FINS、HOMA-IR

升高($P<0.05$);与模型组相比,薯蓣粥组的 FINS、HOMA-IR 降低($P<0.01$);薯蓣粥组和二甲双胍组相比,没有统计学差异($P>0.05$),见表 5。

表 5 各组大鼠 FINS、HOMA-IR 比较
Table 5 Comparison of FINS、HOMA-IR of rats in each group during intervention

组别	FINS(mU/L)	HOMA-IR
空白组	44.44 $\pm$ 2.62	13.53 $\pm$ 2.07
模型组	52.34 $\pm$ 5.15*	49.53 $\pm$ 11.14*
薯蓣粥组	46.44 $\pm$ 4.60#	24.40 $\pm$ 7.62#
二甲双胍组	42.81 $\pm$ 3.95#	26.58 $\pm$ 4.85#

注:两两比较中,*与空白组相比, $P<0.05$;#与模型组相比, $P<0.01$ 。

本研究中,T2DM 模型大鼠的 FINS、HOMA-IR 水平显著升高($P<0.05$),经薯蓣粥干预后,FINS、HOMA-IR 显著下降($P<0.01$),说明薯蓣粥能够有效降低 T2DM 大鼠的胰岛素分泌水平,缓解胰岛素抵抗。有研究表明,炎症因子能够参与胰岛素信号通路并干扰其信号传导,造成胰岛素抵抗^[31-32];TNF- α 、IL-6 都是促炎细胞因子,浓度升高时将加速破坏胰岛细胞,同时还会抑制胰岛素受体底物正常的酪氨酸磷酸化,减少胰岛素受体与胰岛素受体底物的结合阻碍胰岛素信号传导,导致胰岛素抵抗^[32];本研究中,薯蓣粥可能通过以下渠道下调 T2DM 大鼠体内的炎症水平,缓解 IR:a.增加益生菌:薯蓣粥在前期研究基础中被证实能够增加 T2DM 患者的肠道内双歧杆菌含量^[9],有研究显示,双歧杆菌是益生菌,向 T2DM 患者补充双歧杆菌、乳杆菌能够下调患者血液中的 LPS、TNF- α 、IL-6 的含量,降低胰岛素和胰岛素抵抗指数,缓解胰岛素抵抗^[33];b.增加 SCFAs:课题组前期研究已经发现薯蓣粥能够通过改善 T2DM 大鼠肠道菌群,增加 SCFAs,进而降低 IR 水平^[10]。

2.4 各组大鼠 FBG 水平比较

干预过程中,模型组大鼠空腹血糖始终高于 11.1 mmol/L,与空白组相比有统计学意义($P<0.01$)。干预的第 4 周、第 5 周和干预后,模型组大鼠的 FBG 明显低于薯蓣粥组和二甲双胍组,差异具有统计学意义($P<0.01$);在干预期间直至干预结束,薯蓣粥组、二甲双胍组的 FBG 相比,没有统计学差异($P>0.05$,见表 6)。重复测量方差分析显示,各组大鼠 FBG 变化存在时间效应($F=2.818$, $P=0.022$)、分组效应($F=41.269$, $P=0.000$),即不同的干预方法和干预时间将影响 T2DM 大鼠的 FBG。

本研究发现,T2DM 模型大鼠 FBG 明显升高,经薯蓣粥干预后出现显著下降($P<0.01$),薯蓣粥和二甲双胍的降糖效果没有显著差异($P>0.05$);说明 T2DM 大鼠血糖升高,经薯蓣粥灌胃后得到明显改善。薯蓣粥仅由一味生怀山药构成,山药及其有效成分具有降糖作用:山药多糖能够改善高脂饮食配合 STZ 诱导的 T2DM 大鼠的糖脂代谢,降低血糖水

表 6 各组大鼠干预期间 FBG 比较($\bar{x} \pm s$, mmol/L)Table 6 Comparison of FBG of rats in each group during intervention ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

组别	第1周	第2周	第3周	第4周	第5周	干预后
空白组	6.14±0.43	6.16±0.53	6.44±0.35	6.06±0.48	6.23±0.34	6.82±0.78
模型组	22.49±5.55 [*]	19.41±4.07 [*]	22.09±5.43 [*]	22.70±3.88 [*]	24.00±4.36 [*]	21.06±8.97 [*]
薯蓣粥组	17.11±8.87	17.44±6.59	17.50±3.61	15.48±2.92 [#]	13.76±2.93 [#]	12.11±2.60 [#]
二甲双胍组	19.61±5.53	18.45±5.42	18.10±3.96	16.60±2.25 [#]	14.25±2.02 [#]	12.79±2.01 [#]

平^[34]; 薯蓣皂苷能减轻糖尿病肾病大鼠的肾损伤, 减低血糖水平^[35]。IR 是 T2DM 的典型标志, 机体对胰岛素的利用、清除能力下降将导致血糖升高, 而持续的高胰岛素、高血糖水平会进一步加重 IR, 缓解 IR 水平将有助于降低血糖水平, 改善 T2DM 疾病预后^[36]。综上所述, 可以得出: 薯蓣粥能够通过调节 T2DM 大鼠 SCFAs 的含量, 降低肠道炎症, 维护肠道屏障功能, 降低肠道通透性, 进而减轻全身炎症反应, 达到缓解 IR, 降低血糖的效果。

3 结论

本研究制造了 T2DM 大鼠模型, 并进行为期 6 周的灌胃实验, 最终发现: 薯蓣粥能够下调 T2DM 大鼠结肠 TNF- α 、IL-6 的表达水平, 缓解肠道炎症水平, 促进结肠紧密连接蛋白 Occludin、ZO-1 的表达水平提高, 减轻肠道损伤, 维护肠道屏障功能, 降低肠道通透性, 进而下调血清中 Zonulin、LPS、TNF- α 、IL-6 的表达水平, 降低血清空腹胰岛素含量、胰岛素抵抗指数、空腹血糖。即薯蓣粥能够通过减轻 T2DM 大鼠肠道炎症水平, 促进肠道通透性下降, 进而下调全身炎症水平, 缓解胰岛素抵抗, 改善血糖。

参考文献

- [1] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2020 年版)[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2021, 37(4): 311–398. [Chinese Diabetes Society. Guideline for prevention and treatment of type 2 diabetes in China (2020 Edition)[J]. Chin J Endocrinol Metab, 2021, 37(4): 311–398.]
- [2] 万仁辉, 鲁瑾. 2 型糖尿病大血管并发症的影响因素[J]. 第二军医大学学报, 2020, 41(1): 75–80. [WAN Renhui, LU Jin. Influencing factors of macrovascular complications in type 2 diabetes mellitus[J]. Academic Journal of Second Military Medical University, 2020, 41(1): 75–80.]
- [3] WINER D A, LUCK H, TSAI S, et al. The intestinal immune system in obesity and insulin resistance[J]. Cell Metab, 2016, 23(3): 413–426.
- [4] THAISS C A, MAAYAN L, INNA G, et al. Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection[J]. Science, 2018, 359(Mar. 23 TN. 6382): 1376–1383.
- [5] 韩煦, 姚政, 李俊燕, 等. 肠道免疫-慢性炎症与胰岛素抵抗及中医药治疗研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(6): 2620–2623. [HAN Xu, YAO Zheng, LI Junyan, et al. Research progress on intestinal immunity-chronic inflammation, insulin resistance and traditional Chinese medicine treatment[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2019, 34(6): 2620–2623.]
- [6] 汪丽娟, 朱晓波. 肠道慢性炎症与 2 型糖尿病[J]. 生理科学

进展, 2018, 49(6): 443–447. [WANG Lijuan, ZHU Xiaobo. Chronic intestinal inflammation and type 2 diabetes mellitus[J]. Progress in Physiological Sciences, 2018, 49(6): 443–447.]

[7] CHEN T, KIM CY, KAUR A, et al. Dietary fibre-based SCFA mixtures promote both protection and repair of intestinal epithelial barrier function in a Caco-2 cell model[J]. Food Funct, 2017, 8: 1166–1173.

[8] CHANG H K. Microbiota or short-chain fatty acids: which regulates diabetes?[J]. Cellular & Molecular Immunology, 2017, 15(2).

[9] 庞书勤, 辛惠明, 刘玲玉, 等. 薯蓣粥对 2 型糖尿病肠道内双歧杆菌及血糖影响研究[J]. 中国实用内科杂志, 2017, 37(3): 247–250. [PANG Shuqin, XIN Huiming, LIU Lingyu, et al. Effect of yam gruel on bifidobacterium in the gut of patients with type 2 diabetes[J]. Chinese Journal of Practical Internal Medicine, 2017, 37(3): 247–250.]

[10] 洪雪珮, 庞书勤, 周建, 等. 薯蓣粥对 T2DM 大鼠肠道微生物、血糖、胰岛素的影响[J/OL]. 食品工业科技: 1–10 [2021-02-15]. https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020090192. [HONG Xuepei, PANG Shuqin, ZHOU Jian, et al. Effects of Yam gruel on gut microflora, blood glucose and insulin in T2DM rats[J/OL]. Science and Technology of Food Industry: 1–10[2021-02-15]. https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020090192.]

[11] 徐叔云, 卞如钪, 陈修. 药理实验方法学[M]. 第 4 版, 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1861. [XU Shuyun, BIAN Rulian, CHEN Xiu. Methodology of pharmacological experiment[M]. 4th Edition, Beijing: People's Health Publishing House, 2006: 1861.]

[12] 林心君, 王麒又, 辛金钟, 等. 高成模率和高稳定性的糖尿病大鼠模型制备——高脂高糖膳食+STZ 体重联合体表面积法构建糖尿病大鼠模型[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(9): 2051–2054. [LIN Xinjun, WANG Linyou, XIN Jinzhong, et al. The study of establishing a highly stable and successful diabetic rat model[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2013, 33(9): 2051–2054.]

[13] 蒋宛瑾, 谢聪, 喻嵘, 等. 白虎加入参汤对转基因 2 型糖尿病 MKR 小鼠肠道 TLR4/NF- κ B 信号通路及肠道屏障功能的影响[J]. 中草药, 2020, 51(11): 3005–3012. [JIANG Wanjin, XIE Cong, YU Rong, et al. Effect of Baihu and Renshen decoction on intestinal TLR4/NF- κ B signaling pathway and intestinal barrier in type 2 diabetes MKR mice[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2020, 51(11): 3005–3012.]

[14] 于爽. NLRP3 炎症小体参与食管鳞癌增殖、侵袭和迁移并介导荷瘤小鼠顺铂抵抗[D]. 郑州: 郑州大学, 2020. [YU Shuang. NLRP3 inflammasome participates in the proliferation, invasion and migration of esophageal squamous cell carcinoma and mediates cisplatin resistance in tumor-bearing mice[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2020.]

[15] 许女, 郭宏萍, 杨光, 等. 山西老陈醋源植物乳杆菌 173 对

- Ⅱ型糖尿病大鼠的降血糖机制[J]. 中国食品学报, 2020, 20(12): 131–140. [XU Nv, GUO Hongping, YANG Guang, et al. Hypoglycemic mechanism of *Lactobacillus plantarum* 173 from Shanxi, Chen Cuyuan, in type 2 diabetic rats[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(12): 131–140.]
- [16] 王语聪, 谢智鑫, 张学艳, 等. 阿拉伯半乳糖对2型糖尿病大鼠肠道碱性磷酸酶、细菌内毒素和肠道中细胞因子的影响[J/OL]. 食品工业科技: 1–13 [2021-02-19]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020090167>. [WANG Yucong, XIE Zhixin, ZHANG Xueyan, et al. Effect of arabinogalactan on intestinal alkaline phosphatase, bacterial endotoxin and serum cytokines in type 2 diabetic rats[J/OL]. Science and Technology of Food Industry: 1–13 [2021-02-19]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020090167>.]
- [17] ROHR M W, NARASIMHULU C A, RUDESKI-ROHR T A, et al. Negative effects of a high-fat diet on intestinal permeability: A review[J]. Advances in Nutrition, 2019, 11(1).
- [18] WANG R X, LEE J S, CAMPBELL E L, et al. Microbiota-derived butyrate dynamically regulates intestinal homeostasis through regulation of actin-associated protein synaptopodin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2020, 117(21): 201917597.
- [19] 刘颖, 常志尚, 徐宏伟, 等. 糖尿病大鼠肠黏膜屏障损伤检测方法的评价及蜂胶降糖作用的探讨[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(3): 30–36. [LIU Ying, CHANG Zhishang, XU Hongwei, et al. Evaluation of methods for detecting intestinal mucosal barrier damage and exploration of the hypoglycemic effect of propolis in diabetic rats[J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(3): 30–36.]
- [20] LI Pan, XIAO Nan, ZENG Liping, et al. Structural characteristics of a mannoglucan isolated from Chinese yam and its treatment effects against gut microbiota dysbiosis and DSS-induced colitis in mice[J]. Carbohydrate Polymers, 2020: 250.
- [21] HISAKO KAYAMA, RYU OKUMURA, KIYOSHI TAKE-DA. Interaction between the microbiota, epithelia, and immune cells in the intestine[J]. Annual Review of Immunology, 2020: 38.
- [22] TONG L C, WANG Y, WANG Z B, et al. Propionate ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis by improving intestinal barrier function and reducing inflammation and oxidative stress[J]. Front Pharmacol, 2016, 7: 253.
- [23] 袁本银, 马坤岭. Zonulin在糖脂代谢紊乱中作用的研究进展[J]. 东南大学学报(医学版), 2019, 38(3): 532–535. [YUAN Benyin, MA Kunling. Research progress of zonulin in the disorder of glucose and lipid metabolism[J]. Journal of Southeast University(Medical Science Edition), 2019, 38(3): 532–535.]
- [24] JIANG Wanjin, XIE Cong, YU Rong, et al. Effect of Baihu and Renshen decoction on intestinal TLR4/NF- κ B signaling pathway and intestinal barrier in type 2 diabetes MKR mice[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2020, 51(11): 3005–3012.
- [25] 朱佳杰, 刘珊, 郭宇, 等. 姜黄素对肠道屏障的作用及机制[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2021, 29(2): 147–150. [ZHU Jiajie, LIU Shan, GUO Yu, et al. Effect and mechanisms of curcumin on intestinal barrier function[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Digestion, 2021, 29(2): 147–150.]
- [26] LI B, XU P, WU S, et al. Diosgenin attenuates lipopolysaccharide-induced parkinson's disease by inhibiting the TLR/NF- κ B pathway[J]. Journal of Alzheimers Disease, 2018, 64(3): 1–13.
- [27] ZAHRA KIASALARI, TAYEBEH RAHMANI, NARGES MAHMOUDI, et al. Diosgenin ameliorates development of neuropathic pain in diabetic rats: Involvement of oxidative stress and inflammation[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 86: 654–661.
- [28] KIM Y A, KEOGH J B, CLIFTON P M. Probiotics, prebiotics, synbiotics and insulin sensitivity[J]. Nutrition Research Reviews, 2017: 1–17.
- [29] KOH A, DE VADDER F, KOVATCHEVA-DATCHARY P, et al. From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites[J]. Cell, 2016, 165(6): 1332–1345.
- [30] FUJISAKA S, USUI I, NAWAZ A, et al. Bofutsushosan improves gut barrier function with a bloom of *Akkermansia muciniphila* and improves glucose metabolism in mice with diet-induced obesity[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 1–13.
- [31] 张小雨, 高源, 齐云. 代谢性炎症在代谢综合征中的作用[J]. 生命科学, 2021, 33(1): 15–25. [ZHANG XiaoYu, GAO Yuan, QI Yun. The role of metaflammation in metabolic syndrome[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2021, 33(1): 15–25.]
- [32] 魏伊秋, 李满, 余佳. 慢性炎症与胰岛素抵抗机制关系的研究进展[J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(3): 640–645. [WEI Yiqiu, LI Man, YU Jia. Research progress in the relationship between chronic inflammation and insulin resistance[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2019, 39(3): 640–645.]
- [33] SHAUN SABICO, AYAH AL-MASHHARAWI, NASSER M. AL-DAGHRI, et al. Effects of a 6-month multi-strain probiotics supplementation in endotoxemic, inflammatory and cardiometabolic status of T2DM patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial[J]. Clinical Nutrition, 2019, 38(4): 1561–1569.
- [34] 植飞, 邢琪昌, 汪莹, 等. 佛手山药多糖对2型糖尿病大鼠糖脂代谢及氧化应激的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(5): 262–266. [ZHI Fei, XING Qi-chang, WANG Ying, et al. Effect of *Dioscorea opposita* Thunb. polysaccharide on glycolipid metabolism and oxidative stress in type 2 diabetic rats[J]. Food Science, 2017, 38(5): 262–266.]
- [35] CAI Shengyu, CHEN Jiaxu, LI Yousheng. Dioscin protects against diabetic nephropathy by inhibiting renal inflammation through TLR4/NF- κ B pathway in mice[J]. Immunobiology, 2020, 225(3): 151941.
- [36] 曹泽标, 刘超男, 王保华, 等. 基于“火热论”探讨“胰岛素抵抗-胰岛 β 细胞缺陷-高血糖-2型糖尿病”网[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(8): 3668–3671. [CAO Zebiao, LIU Chaonan, WANG Baohua, et al. Discussion on network of ‘insulin resistance-pancreatic beta cell defect-hyperglycemia T2DM’ based on ‘fire-heat theory’[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2019, 34(8): 3668–3671.]