

去卵巢大鼠肠道菌群结构和功能的变化及二仙汤的干预作用

胡晶, 姜燕华, 王昱涵, 杨莹, 刘燕君, 刘海霞, 张治国*, 陈彦静*

(中国中医科学院 中医基础理论研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 采用16S rRNA基因测序探讨二仙汤对大鼠去卵巢后肠道菌群变化的干预作用。方法: 将32只雌性健康SD大鼠随机分为4组, 每组8只, 分别为假手术(Sham)组、模型(OVX)组、雌激素(E)组及二仙汤(EXD)组。E组、EXD组分别以 $1.8 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量戊酸雌二醇药液、 $9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量二仙汤进行灌胃, 余下两组给予等体积蒸馏水, 1次/d, 持续16周。16周后, 检测大鼠血清雌激素及血脂四项水平, 提取大鼠粪便DNA, 给予16S rRNA基因测序并分析结果。结果: 与Sham组比较, OVX组血清雌激素水平显著降低($P < 0.01$), 血清总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平明显升高($P < 0.05$), 与OVX组比较, E组与EXD组血清雌激素水平显著升高($P < 0.01$), TC、LDL-C水平明显降低($P < 0.05$)。Alpha多样性显示, 去卵巢后肠道菌群多样性无显著性变化。Beta多样性显示, 4组菌群结构具有显著性差异, 二仙汤干预可以改善去卵巢后肠道菌群变化。利用LEfSe分析4组差异菌群, Sham组与OVX组有3个差异菌门、18个差异菌属, OVX组与E组有1个差异菌门、12个差异菌属, OVX组与EXD组有3个差异菌门、5个差异菌属。雌激素干预可以使OVX组瘤胃球菌1(*Ruminococcus 1*)、厌氧弧菌(*Anaerovibrio*)、苏黎世杆菌(*Turicibacter*)3种菌属变化趋势逆转恢复; 二仙汤干预可以使OVX组拟杆菌门和厚壁菌门2种菌门变化趋势逆转恢复, 普雷沃氏菌9(*Prevotella 9*)、瘤胃球菌科UCG-014属(*Ruminococcaceae UCG-014*)、瘤胃球菌1(*Ruminococcus 1*)、纺锤链杆菌(*Fusicatenibacter*)4种菌属变化趋势逆转恢复。结论: 去卵巢大鼠肠道菌群结构和功能发生明显改变, 二仙汤可以改善这种变化。

[关键词] 16S rRNA基因测序; 去卵巢大鼠; 肠道菌群; 二仙汤; 脂代谢

[中图分类号] R2-0; R33; R289; R574.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)12-0061-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221237 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220331.1005.002.html>

[网络出版日期] 2022-04-01 10:36

Changes in Intestinal Microflora and Lipid Metabolism in Ovariectomized Rats and Regulatory Effect of Erxian Decoction

HU Jing, JIANG Yan-hua, WANG Yu-han, YANG Ying, LIU Yan-jun, LIU Hai-xia,
ZHANG Zhi-guo*, CHEN Yan-jing*

(Institute of Basic Theory of Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences,
Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the intervention effect of Erxian decoction on intestinal microflora after ovariectomy in rats by 16S rRNA gene sequencing. **Method:** Thirty-two female healthy SD rats were randomly divided into a Sham operation (Sham) group, a model (OVX) group, an estrogen (E) group, and an Erxian decoction (EXD) group, with 8 rats in each group. The rats in the E group and the EXD group received $1.8 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ estradiol valerate solution and $9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ Erxian decoction, respectively, and those in the Sham

[收稿日期] 2021-12-30

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82074297); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(YZ-202041); 中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A00107)

[第一作者] 胡晶, 在读硕士, 从事中医药防治心血管病的基础研究, Tel: 010-64089029, E-mail: huhum17@163.com

[通信作者] * 张治国, 博士, 研究员, 从事中医药防治代谢性疾病的基础研究, Tel: 010-64025179, E-mail: zzzgcm@163.com;

* 陈彦静, 博士, 教授, 从事中医药防治心血管病的基础研究, Tel: 010-64089029, E-mail: chenyj010@163.com

group and the OVX group received an equal volume of distilled water once a day for 16 weeks. After 16 weeks, the levels of serum estrogen and blood lipid were detected. The fecal DNA was extracted, followed by 16S rRNA gene sequencing and analysis. **Result:** Compared with the Sham group, the OVX group showed reduced serum estrogen level ($P<0.01$) and increased serum levels of total cholesterol (TC) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) ($P<0.05$). Compared with the OVX group, the E group and the EXD group showed increased serum estrogen level ($P<0.01$) and reduced TC and LDL-C ($P<0.05$). Alpha diversity showed that there was no significant change in intestinal microflora diversity after ovariectomy. Beta diversity showed that there were significant differences in the structure of intestinal microflora in the four groups. The intervention of Erxian decoction could improve the changes in intestinal microflora after ovariectomy. LEfSe was used to analyze the differential flora in the four groups. The results showed that the Sham group and the OVX group had 3 differential bacterial phyla and 18 differential bacterial genera, the OVX group and the E group had 1 differential bacterial phylum and 12 differential bacterial genera, and the OVX group and the EXD group had 3 differential bacterial phyla and 5 differential bacterial genera. Estrogen intervention could reverse the change trend of *Ruminococcus* 1, *Anaerovibrio*, and *Turicibacter* in the OVX group. Erxian decoction intervention could reverse the change trend of Bacteroidetes, Firmicutes, *Prevotella* 9, *Ruminococcaceae* UCG-014, *Ruminococcus* 1, and *Fusicatenibacter* in the OVX group. **Conclusion:** The structure and function of intestinal microflora in ovariectomized rats changed obviously, and Erxian decoction could ameliorate the change.

[Keywords] 16S rRNA gene sequencing; ovariectomized rats; intestinal flora; Erxian decoction; lipid metabolism

寄居在人体内的肠道微生物群具有消化食物、合成必需维生素、刺激和调节免疫系统、支持肠道功能等作用,与人体健康关系密切。肠道菌群还可以通过氧化三甲胺、短链脂肪酸、胆汁酸等代谢物途径与人体相互作用,参与疾病发生发展^[1]。有研究表明,人体95%的疾病与肠道菌群存在一定关系,如代谢性疾病、心血管疾病及胃肠道疾病等^[2-3]。新近研究显示,肠道菌群和雌激素关系密切,女性更年期后雌激素水平显著下降,肠道菌群结构和功能发生变化^[4-5]。基础研究也已证实,雌性大、小鼠去卵巢后肠道菌群结构和功能均发生改变^[6-7]。女性绝经期后心脑血管病及代谢性疾病发病率显著增高与肠道菌群相关性引起广泛关注,如何改善更年期肠道菌群成为近年临床和基础研究的热点^[8-10]。中草药以肠道菌群为靶点改善人体疾病的潜在治疗机制逐渐被发现^[11-13]。中医理论认为更年期疾病的治病之本为肾虚,上海名医张伯讷教授在上世纪50年代研制的原创补肾方剂二仙汤,具有温肾阳,补肾精,温润养血,调理冲任的作用,临床上常用于治疗更年期相关疾病。课题组前期研究发现,二仙汤可以改善去卵巢模型大鼠血压、心功能、冠脉内皮细胞功能及糖脂代谢等异常变化^[14-16]。然而,二仙汤是否对去卵巢大鼠肠道菌群结构和功能紊乱具有调节作用,目前未有研究报道。

因此,本研究以去卵巢大鼠为模型,采用16S

rRNA基因测序方法并对其结果进行PICRUST功能预测分析,观察去卵巢大鼠肠道菌群结构和功能的变化及二仙汤的干预作用,确定二仙汤的生物学效应与肠道微生物组变化之间的潜在相关性,并为二仙汤治疗绝经后相关疾病提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 10周龄雌性SPF级SD大鼠,32只,体重(180±20)g,由北京斯贝福生物技术有限公司提供,合格证号SCXK(京)2016-0002。所有动物均饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物中心清洁级动物房,实验过程中完全遵照中国中医科学院中医基础理论研究所动物实验伦理规定(伦理委员会审查编号2019-034),饲养温度控制在(24±2)℃,湿度范围45%~60%,自由摄食饮水。

1.2 饲料 基础普通饲料,由北京科澳协力饲料有限公司提供,成分:玉米、豆粕、鱼粉、面粉、麸皮、食盐、磷酸铵钙、石粉、多种维生素、多种微量元素、氨基酸等。饲料合格证号SCXK(京)2014-0010,产品批号17123151。

1.3 药品 二仙汤组成:仙茅9g、淫羊藿9g、巴戟天9g、当归9g、知母4.5g、黄柏4.5g,药物比例为2:2:2:2:1:1,所有饮片均购自北京仟草中药饮片有限公司。煎煮方法:将所有饮片浸泡0.5h,武火煎至沸腾,后继续用文火煎煮30min,倒出药液,继续加水武火煎煮至沸腾,再改用文火煎30min,将两

次煎煮的药液混合并浓缩至含生药质量浓度为 $0.9\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待用。戊酸雌二醇片 9.2 mg (拜耳医药保健有限公司广州分公司,批号398A),用生理盐水 500 mL 溶解,制备成质量浓度为 $0.018\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的戊酸雌二醇药液,置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待用。

1.4 试剂 DNA抽提试剂盒(广州Magen公司,批号D6356-02);DNA荧光定量检测试剂盒(美国赛默飞公司,批号Q32854);Tks Gflex DNA聚合酶(日本Takara公司,批号R060);雌激素放射免疫分析药盒(北京北方生物技术研究所有限公司,批号BFS20191101);总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)检测试剂盒[英科新创(厦门)科技有限公司,批号分别为7361RCQ、9221RCQ、8353RCQ、9214RCQ]。

1.5 仪器 XH-6080型 γ 放射免疫计数器(西安核仪器厂);AU5800型全自动生化仪(美国贝克曼库尔特公司);MULTIFUGE X1R型低温离心机(美国赛默飞公司);AR2130型电子天平、SE3001F型电子天平(美国奥豪斯公司);5418型台式高速离心机(德国艾本德公司);580BR10905型聚合酶链式反应(PCR)仪(美国伯乐公司);SN002358型QIAxtractor高通量核酸纯化工作站(德国Qiagen公司);HE-120型电泳仪(上海天能公司);2100型生物分析仪(美国安捷伦公司);2000型微量紫外分光光度计(美国赛默飞公司)。

2 方法

2.1 更年期大鼠模型制备及给药 雌性SD大鼠适应性饲养1周后,随机选取24只大鼠为去卵巢组进行造模,并将大鼠按体质量随机分组编号,分为模型(OVX)组、雌激素(E)组和二仙汤(EXD)组,每组8只。腹腔注射3%的戊巴比妥钠($1.3\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)进行麻醉,双侧腹背部剃毛备皮并消毒,经腹背部肋弓下 1 cm 和脊柱两侧各 1 cm 交界处,以平行于脊柱方向,分别切2个 2 cm 左右的切口,依次分离肌层、腹膜,于大鼠腹腔接近肾脏位置处找到菜花样玫瑰色的腺体组织,即为卵巢,将其结扎并切除,观察无大出血后将组织放回腹腔,关闭创口并逐层缝合。余下8只作为假手术(Sham)组大鼠,给予相同操作但仅切除腹腔内小块脂肪组织,保留卵巢。在实验结束取材时检查卵巢缺如情况,以验证双侧卵巢完全切除。

大鼠术后2周开始进行药物干预。E组予以

$1.8\times 10^{-4}\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 戊酸雌二醇药液进行灌胃;EXD组予以 $9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ EXD进行灌胃;Sham组、OVX组予以等体积蒸馏水进行灌胃;各组大鼠每天灌胃1次,持续16周。

2.2 大鼠体质量和一般状态观察 每周1次固定时间对各组大鼠进行称体质量并记录数值。同时观察各组大鼠状态,如精神状态、活动度、皮毛光泽度及大小便等情况。

2.3 放射免疫法检测大鼠血浆雌激素水平 给药16周末,将大鼠禁食12 h后用3%戊巴比妥钠麻醉,开腹取腹主动脉血,置于枸橼酸钠抗凝管中,运用 γ 放射免疫计数器测定大鼠血浆雌激素含量。

2.4 粪便取样与检测

2.4.1 粪便采集 实验结束前3 d,每日清晨,戴无菌手套取大鼠提尾应急粪便的第2、3粒新鲜粪便,迅速转移至无菌冻存管, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,整个过程在无菌操作台上进行。

2.4.2 16S rRNA基因测序检测大鼠粪便菌群 每组共8个样本进行DNA抽提质检和建库。将基因组DNA作为模板,使用Tks Gflex DNA聚合酶对16S V3-V4区域进行扩增(上游引物:5'-TACGGRAGGCAGCAG-3',下游引物:5'-AGGGTATCTAATCCT-3',长度455 bp。PCR反应条件为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min,1个循环; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸20 s,26个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$,5 min,1个循环),PCR产物使用电泳检测,检测后使用磁珠纯化,纯化后作为二轮PCR模板,并进行二轮PCR扩增(PCR反应条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min,1个循环; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸20 s,7个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min,1个循环),并再次使用电泳检测,检测后使用磁珠纯化,纯化后对PCR产物进行Qubit定量。根据PCR产物浓度进行等量混样,并上机测序。

2.4.3 PICRUST功能预测分析 使用PICRUST软件将基于Greengenes数据库注释的16S测序数据进行数量标准化,并将其与蛋白质直系同源簇(COG)数据库和京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库进行对比,预测已知微生物基因功能的构成,从而统计不同样本和分组之间在功能上的差异。

2.5 氧化酶法、直接法检测大鼠血清血脂四项含量 给药16周末,将大鼠禁食12 h后用3%戊巴比妥钠麻醉,开腹取腹主动脉血, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\text{ 000 r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min(离心半径 7.5 cm),分离血清保存备用。采用美国贝克曼全自动生化仪AU5800,以氧化酶

法检测血清TC、TG含量,直接法检测血清HDL-C、LDL-C含量。

2.6 统计学分析 使用SPSS 25.0进行统计分析,数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行分析,方差齐时使用最小显著性差异法(LSD)进行两两比较,方差不齐时使用Kruskal-Wallis进行非参数检验,采用Bonferroni法进行两两比较, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。采用Pearson法进行血脂与菌种的相关性分析。

3 结果

3.1 大鼠体质量与血浆 E_2 水平的变化 与Sham组比较,OVX组大鼠体质量显著增加($P < 0.01$),与OVX组比较,E组大鼠体质量显著下降($P < 0.01$),EXD组大鼠体质量明显下降($P < 0.05$)。与Sham组比较,OVX组血浆雌激素水平显著降低($P < 0.01$);与OVX组比较,E组与EXD组血浆雌激素水平均显著升高,差异具有显著统计学意义($P < 0.01$)。见表1。

表1 二仙汤对去卵巢大鼠血浆 E_2 水平的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Effect of Erxian decoction on plasma E_2 level in ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	体质量/g	E_2 /ng·L ⁻¹
Sham组		322.25±14.50	9.37±2.75
OVX组		365.63±26.74 ²⁾	2.85±0.56 ²⁾
E组	1.8×10 ⁻⁴	329.00±19.25 ⁴⁾	7.54±1.20 ⁴⁾
EXD组	9	345.50±12.42 ³⁾	7.80±2.08 ⁴⁾

注:与Sham组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与OVX组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表2和表3同)

3.2 大鼠肠道微生物测序结果 32个样本通过Illumina MiSeq测序生成2.559 384×10⁶条raw data后,分别使用Trimmomatic(version 0.35)、Flash(version 1.2.11)、QIIME中的split_libraries(version 1.8.0)软件对其进行去杂、拼接、进一步质控,总共得到2.404 468×10⁶条clean tags,使用UCHIME(version 2.4.2)去除嵌合体后总共得到2.129 586×10⁶条valid tags,每个样本valid tags平均条数为6.655×10⁴。质控得到的优质序列valid tags按照97%的相似度分类得到6 233个OTUs。4组相同OTU共有3 156个,Sham组共有OTU 4 835个,独有203个,OVX组共有OTU 4 825个,独有202个,E组共有OTU 4 988个,独有269个,EXD组共有OTU 4 501个,独有206个。见图1。

3.2.1 Alpha多样性分析 Rank-Abundance曲线、稀疏曲线见图2,均趋于平缓,证明测序数据量合

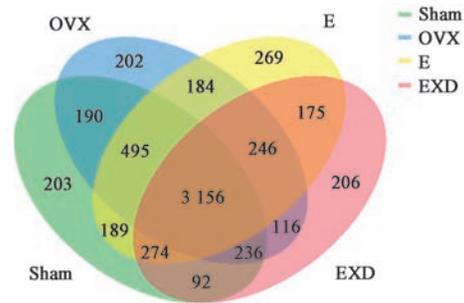
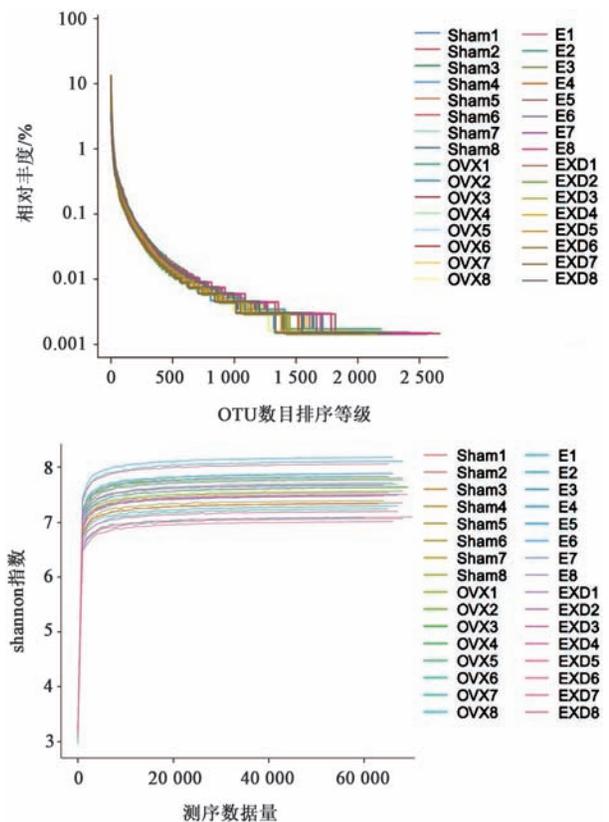


图1 各组大鼠OTUs聚类韦恩

Fig. 1 Wayne diagram of OTUs clustering of rats in each group

理、物种丰富且分布均匀,可有效反映出样品中群落结构的情况。



注:A. 各组大鼠肠道菌群的Rank-Abundance曲线;B. 各组大鼠肠道菌群的样本稀疏曲线

图2 Alpha多样性指数稀疏曲线

Fig. 2 Alpha diversity index sparse curve

Alpha多样性指数见表2。Good's Coverage指数均接近1,表明测序深度已经基本覆盖到样品中所有的物种。与Sham组比较,OVX组Alpha多样性指数无明显变化;与OVX组比较,E组chao1指数、observed species指数明显增加($P < 0.05$),说明物种群落丰度和多样性显著增加。EXD组chao1指数、observed species指数明显降低($P < 0.05$),说明群落物种丰度和多样性显著降低。

表2 二仙汤对去卵巢大鼠Alpha多样性指数的影响 (n=8)

Table 2 Effect of Erxian decoction on Alpha diversity index in ovariectomized rats (n=8)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	chao1($\bar{x}\pm s$)	goods coverage	shannon($\bar{x}\pm s$)	observed species($\bar{x}\pm s$)	simpson($\bar{x}\pm s$)
Sham组		2 876.85±142.18	0.99	7.46±0.23	2 121.20±119.52	0.98±0.004
OVX组		2 887.83±142.86	0.99	7.57±0.29	2 150.04±116.27	0.98±0.007
E组	1.8×10 ⁻⁴	3 188.57±108.23 ³⁾	0.99	7.81±0.28	2 362.70±122.78 ³⁾	0.98±0.007
EXD组	9	2 691.77±151.87 ³⁾	0.99	7.44±0.34	2 008.29±103.34 ³⁾	0.98±0.006

3.2.2 Beta多样性分析 主成分分析(PCoA)见图3, PC1:PC2表示对总体方差解释的百分比为13.5%:8.9%,组间ANOSIM相似性分析显示R=0.89, P=0.001, Sham组与OVX组可分开,说明去卵巢后大鼠肠道菌群发生变化, EXD组与OVX组距离较远,靠近Sham组。提示二仙汤干预可以改善去卵巢大鼠菌群结构的变化。

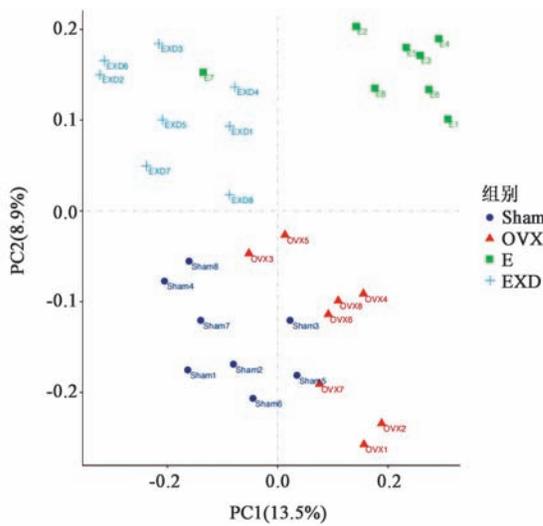


图3 各组大鼠肠道菌群PCoA分析

Fig. 3 PCoA analysis of intestinal flora of rats in each group

3.2.3 菌群结构分析 各组大鼠门分类水平及属分类水平菌群结构分布如图4,其中厚壁菌门与拟杆菌门为优势菌门。结合LEfSe筛选各组显著差异的细菌类群(见增强出版附加材料),利用LDA估算每个组分菌群丰度对差异效果影响的大小。Sham组与OVX组有3个差异菌门、18个差异菌属,OVX组与E组有1个差异菌门、12个差异菌属,OVX组与EXD组有3个差异菌门、5个差异菌属。与Sham组比较,OVX组门分类水平上相对丰度变化最明显的是厚壁菌门的增加和拟杆菌门的减少,属分类水平上相对丰度变化最明显的普雷沃氏菌9(*Prevotella* 9)、罗河杆菌属(*Rhodanobacter*)、厌氧弧菌(*Anaerovibrio*)、蛭弧菌(*Bdellovibrio*)、普雷沃氏菌7(*Prevotella* 7)、朱氏杆菌属(*Chujaibacter*)、变形杆菌属(*Proteus*)的减少和瘤胃球菌科UCG-014

属(*Ruminococcaceae* UCG-014)、瘤胃球菌1(*Ruminococcus* 1)、断链真杆菌属(*Eubacterium fissicatena* group)、毛螺旋菌属UCG-008(*Lachnospiraceae* UCG-008)、毛螺旋菌科ND3007属(*Lachnospiraceae* ND3007 group)、短优杆菌(*Eubacterium brachy* group)的增加。雌激素干预可以使OVX组3种菌属变化趋势逆转恢复,分别是*Ruminococcus* 1、*Anaerovibrio*、苏黎世杆菌(*Turicibacter*);二仙汤干预可以使2种菌门变化趋势逆转恢复,分别是拟杆菌门和厚壁菌门,4种菌属变化趋势逆转恢复,分别是*Prevotella* 9、*Ruminococcaceae* UCG-014、*Ruminococcus* 1、纺锤链杆菌属(*Fusicatenibacter*)。

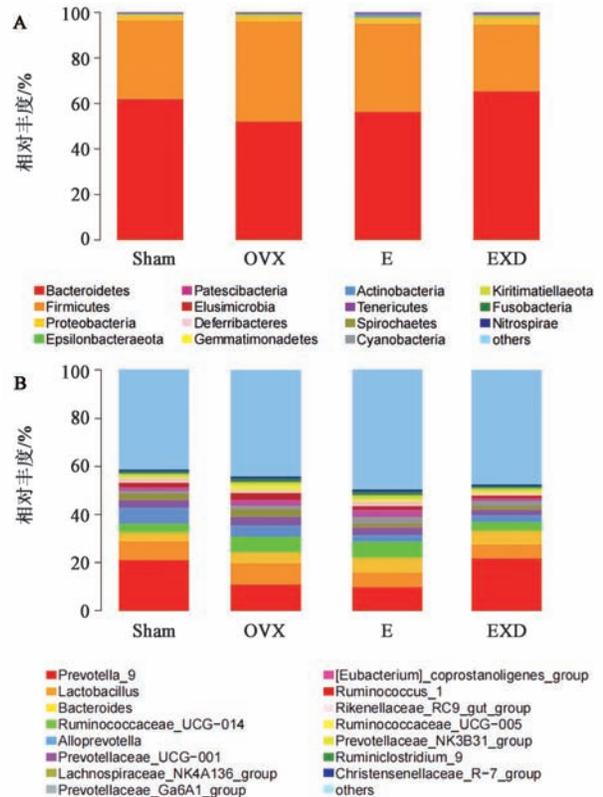


图4 二仙汤对去卵巢大鼠肠道菌群组成的影响

Fig. 4 Effect of Erxian decoction on intestinal flora composition in ovariectomized rats

3.2.4 PICRUST1 功能预测分析 KEGG热分析见图5,红色为正相关,蓝色为负相关,L2层次上,EXD

干预后与25条通路呈正相关:消化系统多糖的生物合成和代谢、运输和分解代谢、新陈代谢、脂质代谢、碳水化合物代谢、氨基酸代谢、遗传信息处理、复制和修复、细胞过程和信号、特征不佳、酶家族、萜类和聚酮类的代谢、折叠,分类和退化、核苷酸代

谢、细胞生长与死亡、传染病、其他氨基酸的代谢、免疫系统、其他次生代谢产物的生物合成、辅助因子和维生素的代谢、能量代谢、生物降解和代谢、免疫系统疾病、信号分子与相互作用。预测结果可知, EXD干预后可影响去卵巢大鼠体内糖脂代谢进程。

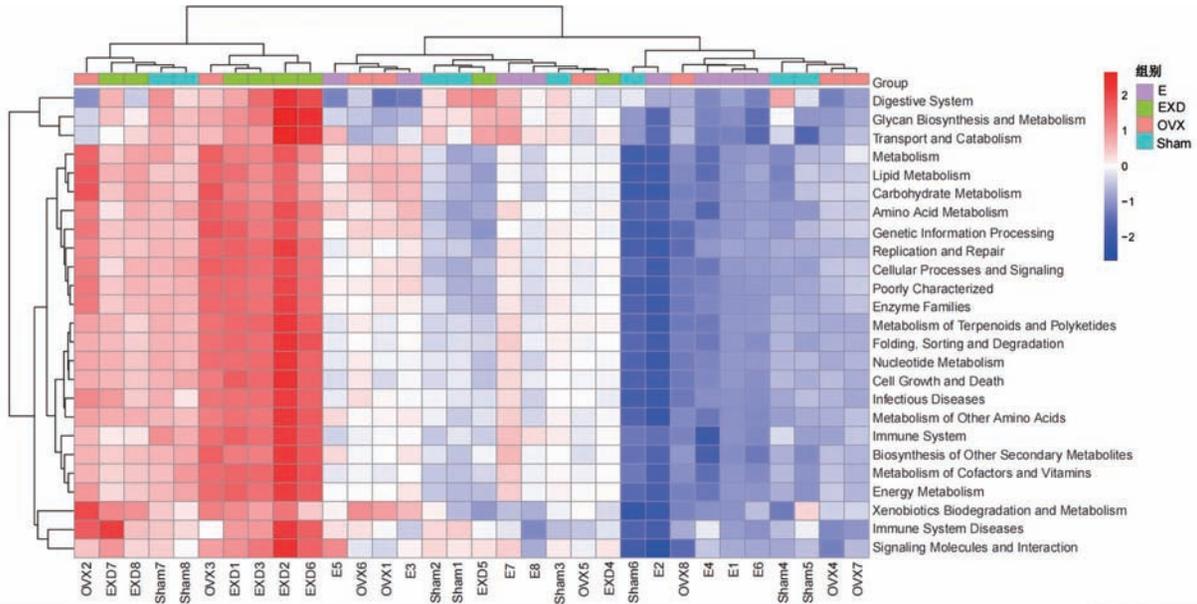


图5 各组大鼠KEGG热分析(L2层级)

Fig. 5 KEGG heatmap analysis of rats in each group (L2 level)

3.3 大鼠血清血脂四项检测结果 与Sham组比较,去卵巢后OVX组血清TC水平有升高趋势、LDL-C水平明显上升($P < 0.05$);与OVX组比较,E和EXD干预后均可降低血清TC、LDL-C含量($P < 0.05$)。说明EXD干预可以改善大鼠体内与去卵巢相关的血脂异常。见表3。

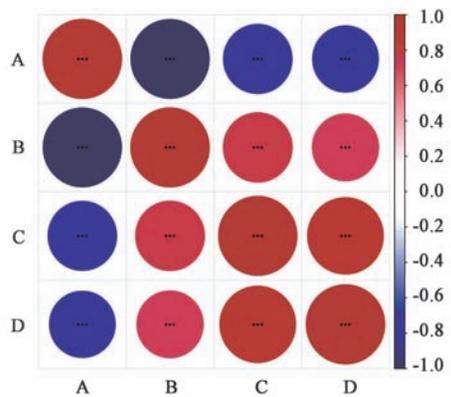
表3 二仙汤对去卵巢大鼠血清TC、TG、HDL-C、LDL-C的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Effect of Erxian decoction on contents of serum TC, TG, HDL-C and LDL-C in ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TC	TG	HDL-C	LDL-C
Sham组		2.12±0.30	0.88±0.33	1.38±0.25	0.23±0.06
OVX组		2.45±0.37	0.82±0.46	1.46±0.18	0.34±0.06 ¹⁾
E组	1.8×10 ⁻⁴	1.79±0.35 ³⁾	0.80±0.31	1.21±0.35	0.18±0.04 ³⁾
EXD组	9	1.98±0.25 ³⁾	0.76±0.22	1.29±0.30	0.22±0.02 ³⁾

3.4 大鼠血清血脂水平及肠道高丰度菌门相关性分析 Pearson积差相关系数衡量了两个定量变量之间的线性相关程度,红色表示正相关,蓝色表示负相关。各组大鼠血清TC、LDL-C水平均与变形菌门成负相关,与厚壁菌门成正相关。表明大鼠血清血脂

水平与肠道高丰度菌门具有强相关性。见图6。



注:A. Bacteroidetes; B. Firmicutes; C. TC; D. LDL-C

图6 各组大鼠血清TC、LDL-C及肠道高丰度菌门相关性分析

Fig. 6 Correlation analysis between serum TC, LDL-C and high-abundance bacterial phyla in rats of each group

4 讨论

作为人体“第二基因组”,肠道菌群参与宿主体内许多生理病理变化过程,与机体多个组织、器官存在相互作用,是人体健康的重要保障^[1]。目前,以肠道菌群为靶点治疗各系统疾病是基础和临床研究的热点。研究表明,肠道菌群具有性别二态性,雌激素可通过肠道雌激素受体介导参与调节肠道

菌群稳态^[17]。女性更年期体内激素急剧波动,这种全身性的急剧变化必然会引起消化道微生物群落生境的改变,从而引起微生物群落或区系的改变^[4]。EXD的类雌激素作用已被证实,可以提高大鼠体内雌激素水平,增强下丘脑-垂体-性腺轴的功能,改善卵巢功能^[18-19]。因此本研究基于雌激素对肠道菌群稳态的调节作用及二仙汤的类雌激素作用,研究去卵巢后大鼠肠道菌群的变化及EXD的干预作用。

去卵巢大鼠模型为更年期女性公认的模拟模型,可以很好地模拟更年期女性生理病理的变化^[20]。拟杆菌门和厚壁菌门是大鼠肠道菌群中的优势菌门,而在人体肠道菌群中厚壁菌门和拟杆菌门约占98%以上,说明该模型适合作为更年期模型进行肠道菌群的深入研究。

本实验中,去卵巢后大鼠肠道菌群Alpha多样性指数无显著变化,雌激素干预后Alpha多样性指数显著增加,EXD干预后Alpha多样性指数显著降低,Beta多样性分析显示,Sham组与OVX组可分开,说明去卵巢后大鼠肠道菌群结构和功能发生改变,E组与Sham组距离均较远,EXD组与OVX组距离较远,靠近Sham组。以上结果表明去卵巢对大鼠肠道菌群物种多样性改变不明显,但肠道菌群结构和功能有显著变化,和SAU等^[7]研究结果一致。尽管雌激素干预可使大鼠肠道菌群物种丰度和多样性增加,但对菌群结构并未有明显回调作用,而EXD干预后大鼠肠道菌群结构回调作用显著,表明EXD对大鼠肠道菌群结构的回调作用可能优于雌激素补充治疗。

对大鼠门、属水平菌群结构分析结果显示,在门水平方面,去卵巢后大鼠拟杆菌门减少,厚壁菌门增加,二者比值降低;属水平方面,*Prevotella* 9减少,*Ruminococcus* 1、*Ruminococcaceae* UCG-014增加,EXD干预后可以逆转去卵巢大鼠肠道菌群上述变化。资料显示,绝经后妇女雌激素水平明显下降,拟杆菌门与厚壁菌门比值降低^[4-5],本实验中EXD干预后拟杆菌门和厚壁菌门比值增高,推测与EXD升高雌激素水平有关。此外,有研究发现,肥胖人群拟杆菌门与厚壁菌门比值较低^[21-22],在本实验中,去卵巢大鼠体质量明显增加,EXD干预后体质量明显降低。属水平方面,普雷沃氏菌属属于拟杆菌门,为厌氧菌,有助于分解蛋白质和碳水化合物,擅长从低聚果糖和阿拉伯木聚糖中提取短链脂肪酸丙酸,会影响如高血压、胰岛素抵抗等疾病的发生发展^[23-25]。瘤胃菌属属于厚壁菌门,其丰度与许多代谢疾病成正相关,比如糖尿病、肥胖、血脂代

谢紊乱、酒精性肝炎等^[26]。以上结果说明去卵巢后大鼠肠道菌群结构发生改变,EXD干预可能通过调节大鼠肠道普雷沃氏菌属和瘤胃菌属进而改善去卵巢引起的相关病理变化。

为深入探讨EXD干预对去卵巢大鼠肠道菌群功能的调节作用,笔者对测序结果进行了PICRUST功能预测分析,结果发现,EXD干预后消化系统多糖的生物合成和代谢、运输和分解代谢、新陈代谢、脂质代谢、碳水化合物代谢增强,表明EXD可能通过改善去卵巢大鼠肠道菌群结构和功能,调控体内糖脂代谢。本实验对血脂相关指标的检测证实,去卵巢大鼠血清TC、LDL-C水平升高,血脂代谢紊乱,EXD干预后可以改善这种变化,且血清TC、LDL-C与大鼠粪便拟杆菌门、厚壁菌门有强相关性,表明肠道微生物与宿主体内脂代谢存在密切关系,EXD可以通过肠道微生物途径调节机体血脂代谢紊乱。大量研究表明,肠道微生物群能够调节脂肪储存和宿主代谢,是研究机体脂质和能量代谢必不可少的因素^[27]。且体内脂代谢紊乱与心血管疾病关系密切,血液中LDL-C和TC的堆积可以导致冠状动脉硬化斑块的形成,从而导致心血管疾病的发生^[28]。笔者推测,EXD可能通过肠道菌群调节脂代谢紊乱,对更年期心血管疾病具有保护作用。

从中医角度看,肠道菌群及其代谢物可以直接参与宿主食物消化吸收,与宿主生长、发育和衰老关系密切,这与中医肾主司生长发育,调控脏腑气化相一致,肾虚是肠道菌群失衡的病理基础^[29]。女子七七之年,“任脉虚,太冲脉衰少,天癸竭”,更年期致病之本也在肾虚。肾主水,肾中精气亏虚,肾的蒸腾气化功能失调,津液停聚,聚湿成痰,痹阻于脏腑,导致各系统疾病发生,若聚于血中,血脂失于运化,导致代谢性疾病及心脑血管疾病发生^[30]。补肾方剂EXD以仙茅、淫羊藿为君,巴戟天为臣,可温肾阳、补肾精;当归为使,有温润养血、调理冲任之用;黄柏、知母入肾经,可泻肾火、滋肾阴,为佐药。全方制方精要,临床上常用于治疗更年期相关疾病,距今已有70年历史。因此,可以通过补肾调节肠道菌群,从而改善更年期相关疾病的发生发展。

综上所述,补肾方剂EXD可以改善去卵巢大鼠肠道菌群结构和功能及血脂代谢的紊乱,提示通过调节肠道菌群及其代谢途径可能是EXD改善机体更年期相关疾病的机制之一,也为女性更年期相关疾病的防治提供新的思路。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] FAN Y, PEDERSEN O. Gut microbiota in human metabolic health and disease [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(1):55-71.
- [2] DUTTARROY A K. Role of Gut microbiota and their metabolites on atherosclerosis, hypertension and human blood platelet function: A review [J]. *Nutrients*, 2021, 13(1):144.
- [3] KUMAR D, MUKHERJEE S S, CHAKRABORTY R, et al. The emerging role of gut microbiota in cardiovascular diseases [J]. *Indian Heart J*, 2021, 73(3):264-72.
- [4] 郭在清. 更年期综合征人体肠道微生物群落结构研究[J]. *中国微生态学杂志*, 2015, 27(4):477-479.
- [5] SANTOS-MARCOS J A, RANGEL-ZUNIGA O A, JIMENEZ-LUCENA R, et al. Influence of gender and menopausal status on gut microbiota [J]. *Maturitas*, 2018, 116:43-53.
- [6] MA S, QIN J, HAO Y, et al. Structural and functional changes of gut microbiota in ovariectomized rats and their correlations with altered bone mass [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(11):10736.
- [7] SAU L, OLMSTEAD C M, CUI L J, et al. Alterations in gut microbiota do not play a causal role in diet-independent weight gain caused by ovariectomy [J]. *J Endocr Soc*, 2021, 5(1):173.
- [8] 《中国心血管健康与疾病报告2020》概述[J]. *中国心血管病研究*, 2021, 40(9):885-889.
- [9] EL KHOUDARY S R, AGGARWAL B, BECKIE T M, et al. Menopause transition and cardiovascular disease risk: Implications for timing of early prevention: A scientific statement from the American heart association [J]. *Circulation*, 2020, 142(25):e506-e532.
- [10] MAYNERIS-PERXACHS J, ARNORIAGA-RODRÍGUEZ M, LUQUE-CÓRDOBA D, et al. Gut microbiota steroid sexual dimorphism and its impact on gonadal steroids: Influences of obesity and menopausal status [J]. *Microbiome*, 2020, 8(1):1-15.
- [11] 杨春, 刘仲栋, 宋轶, 等. 中医药调节肠道菌群干预2型糖尿病的研究进展 [J]. *山西中医药大学学报*, 2021, 22(4):298-301.
- [12] 李洪铭, 谢晓莹, 陈振华, 等. 中药降血脂机制研究进展 [J]. *海峡药学*, 2021, 33(7):37-40.
- [13] 厉颖, 李灿委, 范孟然, 等. 中药调控肠道菌群干预酒精性肝病的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(6):107-115.
- [14] 姜燕华, 王昱涵, 刘燕君, 等. 二仙汤对去卵巢大鼠心肌微血管及血液流变学的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(24):59-67.
- [15] 王昱涵, 姜燕华, 向丽华, 等. 二仙汤对去卵巢大鼠心功能和血压动态演变的干预作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(3):53-61.
- [16] ZHANG Z, XIANG L, ZHAO L, et al. The protective effect of Er-Xian decoction against myocardial injury in menopausal rat model [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18(1):1-10.
- [17] 袁欣, 陈瑞敏. 肠道菌群的性别二态性及其潜在影响机制 [J]. *生理科学进展*, 2020, 51(4):248-252.
- [18] WANG Y, LOU X T, SHI Y H, et al. Erxian decoction, a Chinese herbal formula, for menopausal syndrome: An updated systematic review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 234:8-20.
- [19] DU B, LIU L H, LV Y J, et al. Systems pharmacology uncovers multiple mechanisms of Erxian decoction for treatment of premature ovarian failure [J]. *Chin J Integr Med*, 2020, 26(2):106-113.
- [20] MEDINA-CONTRERAS J, VILLALOBOS-MOLINA R, ZARAIN-HERZBERG A, et al. Ovariectomized rodents as a menopausal metabolic syndrome model. A mini review [J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 475(1):261-276.
- [21] 魏明, 田甜, 刘鹏, 等. 去卵巢小鼠肠道菌群和血脂的变化 [J]. *中国微生态学杂志*, 2021, 33(5):502-505.
- [22] 张梓旭. 粪菌移植对小鼠糖脂代谢的影响 [D]. 汕头: 汕头大学, 2021.
- [23] ASTUDILLO A A, MAYROVITZ H N. The gut microbiome and cardiovascular disease [J]. *Cureus*, 2021, 13(4):e14519.
- [24] MARTIN-GALLAUSIAUX C, MARINELLI L, BLOTTIERE H M, et al. SCFA: Mechanisms and functional importance in the gut [J]. *Proc Nutr Soc*, 2021, 80(1):37-49.
- [25] BERTELSEN A, ELBORN J S, SCHOCK B C. Microbial interaction: *Prevotella* spp. reduce *P. aeruginosa* induced inflammation in cystic fibrosis bronchial epithelial cells [J]. *J Cyst Fibros*, 2021, 20(4):682-691.
- [26] PAL D, NASKAR M, BERA A, et al. Chemical synthesis of the pentasaccharide repeating unit of the O-specific polysaccharide from *Ruminococcus gnavus* [J]. *Carbohydr Res*, 2021, 507:108384.
- [27] DELZENNE N M, CANI P D. Interaction between obesity and the gut microbiota: Relevance in nutrition [J]. *Annu Rev Nutr*, 2011, 31:15-31.
- [28] 诸骏仁, 高润霖, 赵水平, 等. 中国成人血脂异常防治指南(2016年修订版) [J]. *中华全科医师杂志*, 2017, 16(1):15-35.
- [29] WANG Z, CHEN K, WU C, et al. An emerging role of *Prevotella histicola* on estrogen deficiency-induced bone loss through the gut microbiota-bone axis in postmenopausal women and in ovariectomized mice [J]. *Am J Clin Nutr*, 2021, 114(4):1304-1313.
- [30] 裘昊, 楼宇舫. 浅述从肾论治脂代谢紊乱 [J]. *浙江中医杂志*, 2014, 49(6):455.

[责任编辑 孙丛丛]