

• 药理与临床 •

基于16 S rRNA基因测序的黄连对2型糖尿病大鼠肠道微生物多样性影响研究

顾宁宁¹, 张兴德^{1,2,3,4*}, 郁红礼^{1,3}, 谢辉^{1,4}, 朱潇潇¹, 李莹², 郑兴忠²

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 南京中医药大学附属盐城市中医院, 江苏 盐城 224000

3. 江苏省中药炮制重点实验室, 江苏 南京 210023

4. 南京中医药大学 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023

摘要: **目的** 探索黄连提取物对2型糖尿病模型大鼠肠道微生物多样性的影响, 探讨黄连治疗消渴证的机制。**方法** 随机选取10只SD大鼠为对照组, 其余大鼠采用特殊膳食诱导与ip链脲佐菌素(STZ)联合制备2型糖尿病模型, 造模成功大鼠随机分为3组: 模型组、黄连提取物(4.36 g/kg)组、二甲双胍(0.097 g/kg)组, 每组10只; 各组均ig给药, 对照组与模型组ig等体积的0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na), 每周监测体重、血糖值各1次, 给药4周后测定口服糖耐量以及胰岛素水平, 给药4周后取其结肠内容物, 进行16 S rRNA基因测序。**结果** 黄连提取物对2型糖尿病大鼠症状均有改善作用, 16 S rRNA基因得到了951个OTU, 15个门、25个纲、43个目、69个科、182个属、357个种; 门水平, 模型组放线菌门(*Actinobacteria*)细菌的量明显高于对照组与黄连提取物组($P<0.05$); 脱铁杆菌门(*Deferribacteres*)只在模型组中检出; 厚壁菌门(*Firmicutes*)、螺旋体门(*Spirochaetae*)、柔膜菌门(*Tenericutes*)、迷踪菌门(*Elusimicrobia*)在模型组中的量均高于对照组, 而给予黄连提取物后, 丰度有所降低; 同时黄连提取物组中变形菌门(*Proteobacteria*)、梭杆菌门(*Fusobacteria*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)的丰度略高于对照组与模型组。**结论** 经膳食联合STZ诱导的2型糖尿病大鼠中放线菌门与脱铁杆菌门可能是潜在的标志菌; 给予黄连提取物后, 肠道菌群多样性发生改变, 提示黄连提取物可以改善2型糖尿病大鼠肠道菌群紊乱。

关键词: 黄连; 16 S rRNA基因测序; 肠道菌群; 2型糖尿病; 放线菌门; 脱铁杆菌门

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)19-3998-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.19.015

Based on sequencing of 16 S rRNA gene elaborate effect of *Coptis chinensis* on intestinal microbial diversity in type 2 diabetes mellitusGU Ning-ning¹, ZHANG Xing-de^{1,2,3,4*}, YU Hong-li^{1,3}, XIE Hui^{1,4}, ZHU Xiao-xiao¹, LI Ying², ZHENG Xing-zhong²

1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Yancheng TCM Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Yancheng 224000, China

3. Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Nanjing 210023, China

4. The Collaborative and Innovation Center of the Process of Industrialization for Traditional Chinese Medicine Resources, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To explore the effect of *Coptis chinensis* on the intestinal microflora diversity of rats with type 2 diabetes mellitus and further elucidate the mechanism of *C. chinensis* in treatment of type 2 diabetes mellitus. **Methods** SD rats were randomly divided into control group (CON), model group (M), *C. chinensis* group (HL), and positive control group (POS), 10 in each group respectively. Type 2 diabetes mellitus model was caused by special diet fed and ip injection of STZ together. CON with M, HL, and POS was respectively given gavage volume 0.5% CMC-Na, 4.36 g/kg *C. chinensis* water extract and 0.097 g/kg of metformin. The body weight and blood glucose were monitored once a week separately. After four weeks of administration, the oral glucose tolerance and insulin level were measured. After four weeks of administration, the contents of rectum were collected and sequenced by a 16 S rRNA gene sequencing.

收稿日期: 2017-05-13

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(81001640)

*通信作者 张兴德(1976—), 男, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为中药炮制、制剂及新型给药系统研究。

Tel: (025)85811517 E-mail: xingde2293@126.com

Results A total of 951 OTU, 15 Phylum, 25 Class, 43 Order, 69 Family, 182 Genus and 357 Species were obtained. At the level of Phylum, the content of *Actinobacteria* in M was significantly higher than that in CON and HL ($P < 0.05$), while *Deferribacteres* was only detected in M. In M, *Firmicutes*, *Spirochaetae*, *Tenericutes*, and *Elusimicrobia* were higher than CON. Interestingly, they were all reduced after giving *C. chinensis*, meanwhile the abundance of *Proteobacteria*, *Fusobacteria* and *Verrucomicrobia* in HL were slightly higher than that in CON and M. **Conclusion** *Actinobacteria* and *Deferribacteres* were probably potential markers in type 2 diabetes mellitus. After administrating *C. chinensis*, the change of intestinal microflora diversity revealed *C. chinensis* could improve the intestinal microflora disorder of type 2 diabetes mellitus.

Key words: *Coptis chinensis* Franch; 16 S rRNA gene sequencing; intestinal microflora; type2 diabetes mellitus; *Actinobacteria*; *Deferribacteres*

糖尿病的发展早期以湿热瘀阻为主, 火热偏盛, 表现为肝热、胃热、肠热、湿热、痰热、毒火等火热内盛之象, 治疗以清泄火热为主, 属于中医学“消渴病”范畴。中医药治疗“消渴病”具有悠久的历史。《本草纲目》:“治消渴, 用酒蒸黄连”, 名医别录也记载“黄连止消渴”。《东医宝鉴》记载, 黄连为治消渴要药, 用时酒浸蒸, 晒干为末, 蜜丸。黄连首载于《神农本草经》, 《中国药典》2015年版规定黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch、三角叶黄连 *Coptis deltoidea* C. Y. Chen et Hsiao 或云连 *Coptis teeta* Wall. 的干燥根茎, 其性味苦、寒, 归心、脾、胃、肝、胆、大肠经。

本研究以“证”与“症”是人肠道内微生态变化产生的某些继发反应而导致的表观现象, 通过药物调理肠内菌群的平衡, 对“证”施以影响起到对症下药达到治疗疾病的目的为切入点, 通过 16 S rRNA 基因测序, 探究 2 型糖尿病肠道微生物的多样性变化, 旨在找出药物治疗疾病时, 肠道微生物的变化以及所起的作用, 进而影响脑-肠-菌轴各部分相互作用, 调控神经-免疫-内分泌网络, 扶正机体, 体现“疗热以寒药”的中医药理论。

1 材料

1.1 仪器

G-421S 血糖试纸、G-421 血糖仪 [爱奥乐医疗器械 (深圳) 有限公司]; 胰岛素检测试剂盒 (天津九鼎生物技术有限公司); New Classic ML 分析天平 (梅特勒-托利多公司); PHS-3C 雷氏 pH 计 (上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

黄连药材 (湖北省恩施州利川市佛宝山黄连种植基地), 经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定为黄连 *Coptis chinensis* Franch 的干燥根茎; 链脲佐菌素 (STZ, 批号 S0130, Sigma 公司); 枸橼酸三钠、枸橼酸 (广东汕头市西陇化工厂); 羧甲基

纤维素钠 (CMC-Na, 上海康朗生物科技有限公司); 氯化钠 (南京化学试剂有限公司); 葡萄糖 (天津市科密欧化学试剂有限公司); 二甲双胍 (批号 02000913, 中美上海施贵宝制药有限公司); 液氮 (南京光芒特种气体有限公司); 高脂高糖饲料 (北京科澳协力饲料有限公司)。

1.3 动物

健康雄性 SD 大鼠, 体质量 200~220 g, SPF 级, 购买于南京市江宁区青龙山动物繁殖场, 许可证号 SCXK (浙) 2014-0001, 饲养于南京中医药大学实验动物中心屏障动物饲养室, 按屏障环境内动物实验观察与操作规范进行实验。

2 方法

2.1 黄连提取物的制备

取黄连药材 2 kg, 加 5 倍量水, 加热回流 2 次, 每次 2 h, 真空干燥成粉状 (HPLC 测得其中含盐酸小檗碱 7.5%、巴马汀 1.68%、黄连碱 2.7%, 表小檗碱 2.2%), 置于干燥器中待用。

2.2 糖尿病大鼠模型制备

SD 大鼠以特殊膳食与 STZ 联合诱导造模, 即以高脂高糖饲料 (20%蔗糖、15%猪油、5%蛋黄粉、60%基础饲料) 喂养大鼠 1 个月, 禁食不禁水 12 h, 一次性 ip 给予 5 mg/kg STZ (采用 pH 4.2~4.5 的 0.1 mol/L 枸橼酸三钠-枸橼酸缓冲液配制), 3 d 后测定血糖, 2 周后血糖依旧稳定, 且空腹血糖 ≥ 11.1 mmol/L 者纳入 2 型糖尿病模型。

2.3 分组与给药

未造模前按体质量随机选取 10 只大鼠为对照组, 将造模成功的 30 只大鼠, 以血糖值随机分为 3 组, 分别为模型组、阳性对照二甲双胍组、黄连提取物组, 每组 10 只; 二甲双胍组 ig 给予一定剂量 (0.097 g/kg) 二甲双胍, 黄连提取物组 ig 给予黄连提取物 4.36 g/kg (根据人临床剂量每天 45 g 折算), 对照组与模型组 ig 等体积 0.5% CMC-Na, 每天给药 1 次, 连续给药 30 d。

2.4 口服糖耐量的测定

给药4周后,空腹12 h,每组以2 g/kg 剂量 ig 葡萄糖,分别测定给予葡萄糖后 0、15、30、60、120 min 的血糖值。

2.5 空腹血糖和胰岛素水平的测定

末次给药后,各组大鼠禁食不禁水12 h,眼眶取血,用血糖仪测定空腹血糖值,按试剂盒方法测定胰岛素水平,计算其胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)。

$$\text{HOMA-IR} = \text{空腹胰岛素值} \times \text{空腹血糖值} / 22.5$$

2.6 体质量和尿量的检测

给药期间,每周检测1次体质量。末次给药后,称各组大鼠体质量,将各组大鼠置于代谢笼中,收集每只大鼠24 h 尿液,测定尿量。

2.7 粪便取样与检测

给药4周后无菌采集对照组、模型组、黄连提取物组大鼠的直肠段内容物于冻存管中,立即存放至液氮中,2 h 后取出干冰运送至上海美吉生物医药科技有限公司,进行16 S rRNA 基因测序检测。

2.8 数据处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行统计,组间比较采用 LSD 多重比较。检测显著丰度差异特征、筛选与丰度有显著性差异的类群以及每个组分(物

种)丰度对差异效果影响的大小使用 non-parametric factorial Kruskal-Wallis (KW) sum-rank test (非参数因子克鲁斯卡尔-沃利斯秩和检验)以及线性判别分析(LDA)软件 LEfSe (http://huttenhower.Sph.harvard.edu/galaxy/root?tool_id=lefse_upload)。数据去杂和参数的设置使用软件 FLASH、Trimmomatic; 使用软件平台: Usearch (vsesion 7.0 <http://drive5.com/uparse/>); 分类学分析采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 97%相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析,参考16 S 细菌和古菌核糖体数据库 Silva (Release128 <http://www.arb-silva.de>)。

3 结果

3.1 口服糖耐量测定结果

由图1-A 可以看出,黄连提取物组与模型组相比,血糖上升的幅度以及血糖的最大值都明显降低,说明黄连能够有效地改善2型糖尿病大鼠的糖耐量。

3.2 各组大鼠尿量与体质量比较

黄连提取物组与模型组相比大鼠体质量显著提高($P < 0.05$),大鼠尿量明显降低($P < 0.05$),说明黄连提取物能够改善2型糖尿病大鼠体质量减轻与尿量增多的症状,各组大鼠体质量和尿量测定结果见图1。

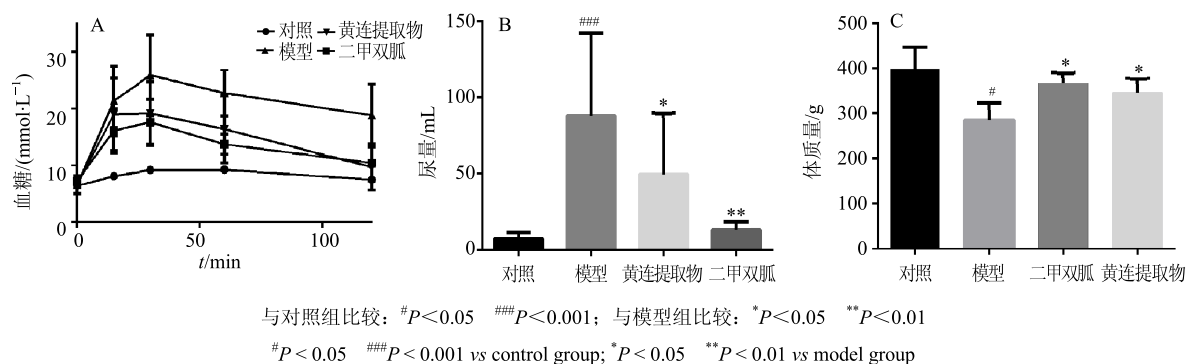


图1 各组大鼠糖耐量(A)、尿量(B)和体质量(C)比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Comparison on oral glucose tolerance (A), urine volume (B), and body weight (C) of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.3 各组大鼠空腹血糖、胰岛素水平和 HOMA-IR 比较

与对照组比较,模型组大鼠空腹血糖和 HOMA-IR 显著升高($P < 0.001$),与模型组比较,黄连提取物组大鼠空腹血糖和 HOMA-IR 均显著降低($P < 0.01$),结果见表1。

3.4 肠道微生物测序结果

根据16 S rRNA 的测序结果,采用 RDP

classifier 贝叶斯算法对 97%相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析,参考16 S 细菌和古菌核糖体数据库 Silva (Release128 <http://www.arb-silva.de>),得到了951个 OTU,15个门、25个纲、43个目、69个科、182个属、357个种。图2的数据结果得到 $P = 0.001$,说明组间具有统计学意义。图3的聚类结果表明各组间微生物群落物种有明显差异。由图4可知对照组、模型组与黄连提取物组中拟杆菌

表 1 各组大鼠空腹血糖、胰岛素和 HOMA-IR 比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Comparison on fasting blood glucose, insulin, and HOMA-IR index of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	空腹血糖/ (mmol·L ⁻¹)	胰岛素/ (mU·L ⁻¹)	HOMA-IR
对照	—	6.80±1.12	6.09±0.73	0.61±0.30
模型	—	22.14±7.23 ^{####}	7.51±1.08 [#]	1.94±0.37 ^{####}
二甲双胍	0.097	15.50±7.34 ^{**}	6.62±0.23 ^{**}	1.71±0.49 [*]
黄连提取物	4.36	13.82±7.85 ^{**}	5.33±0.33 [*]	1.47±0.64 ^{**}

与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{####} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

[#] $P < 0.05$ ^{####} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

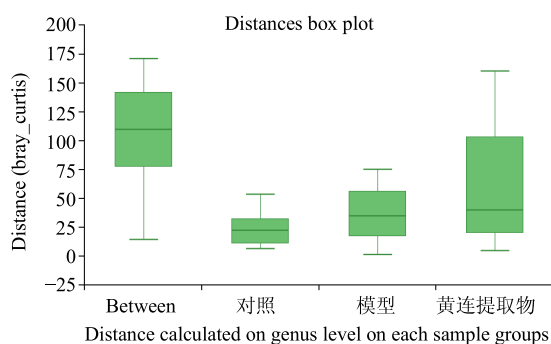


图 2 组间相似性分析检验组间差异的显著性

Fig. 2 Similarity analysis of significant differences among groups

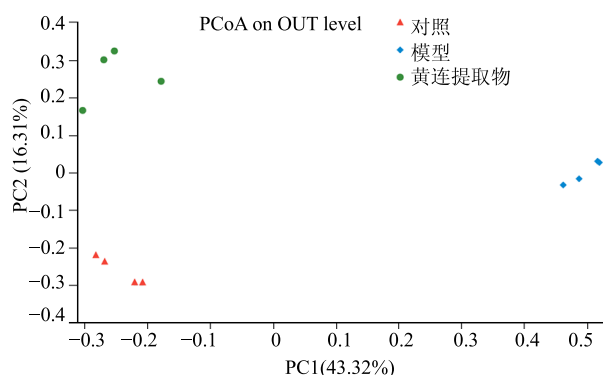


图 3 微生物群落间的差异分析

Fig. 3 Analysis of differences between microbial communities

门 (*Bacteroides*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*) 的丰度都较高, 为优势菌群; 在对照组中拟杆菌门 (*Bacteroides*) 的丰度高达 53.07%, 厚壁菌门在模型组中的丰度高达 43.23%, 且在黄连提取物组中梭杆菌门 (*Fusobacteria*) 的丰度显著高于对照组与模型组 ($P < 0.01$), 而在模型组中放线菌门 (*Actinobacteria*) 的丰度明显高于对照组与黄连提取物组 ($P < 0.05$); 脱铁杆菌门 (*Deferribacteres*) 只在模型组中含有, 在对照组与黄连提取物组中, 均

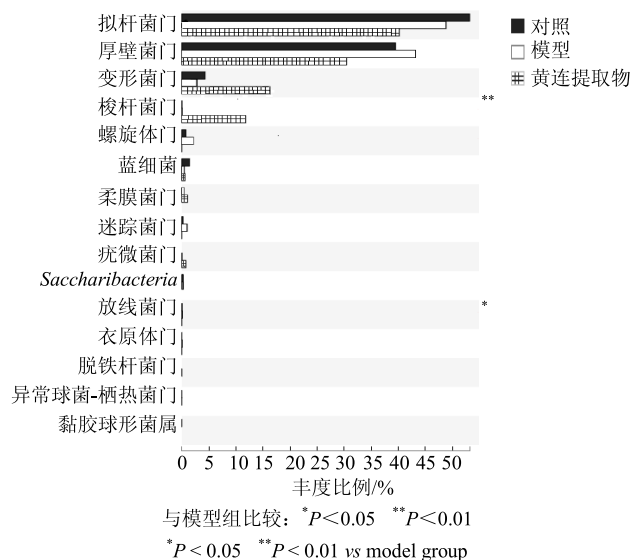


图 4 微生物群落中丰度差异显著的物种分析

Fig. 4 Analysis of species richness in microbial community with significant difference

未检测到, 说明在经膳食联合 STZ 诱导的 2 型糖尿病模型中放线菌门与脱铁杆菌门可能是潜在的标志菌。螺旋体门 (*Spirochaetae*)、柔膜菌门 (*Tenericutes*)、脱铁杆菌门、黏胶球形菌 (*Lentisphaerae*) 在黄连提取物组中均未检测到, 说明黄连提取物对其可能有一定的抑制作用; 厚壁菌门、螺旋体门、柔膜菌门、迷踪菌门 (*Elusimicrobia*) 在模型组中丰度高于对照组, 而黄连提取物组中的丰度有所降低; 在黄连提取物组中变性菌门 (*Proteobacteria*)、梭杆菌门、疣微菌门 (*Verrucomicrobia*) 的丰度略高于对照组与模型组, 提示黄连提取物可能可以改善模型大鼠肠道菌群的紊乱。由图 5-A HeatMap 中颜色变化与相似程度可以更直接地比较对照组、模型组与黄连提取物组在门水平上群落组成的相似性与差异性, 图 5-B 中, 分析了 15 个门与口服糖耐量曲线下面积 (AUC) 与 HOMA-IR 的相关性, 由图可知梭杆菌门的相关性较低, 而放线菌门与脱铁杆菌门相关性较高。由图 6 可知不同门之间的进化远近关系, 值得注意的是, 拟杆菌门进化距离最大, 说明其与厚壁菌门等菌种的进化关系较远。

4 讨论

运用黄连治疗消渴症具有一定的依据, 有关研究报道黄连的主要成分是异喹啉类生物碱, 主要包括小檗碱、巴马汀、黄连甲基碱等, 其中小檗碱是其主要成分。小檗碱可以通过调节 P 细胞功能抑制

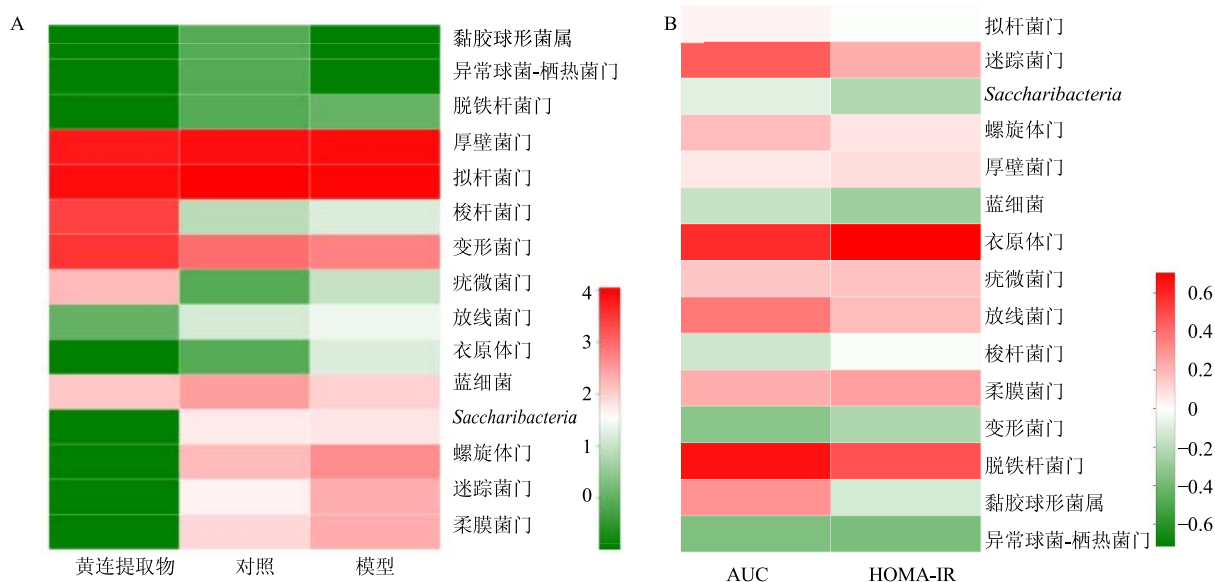


图 5 不同组间各物种门水平上群落组成的相似性与差异性 (A) 和口服糖耐量曲线下面积、HOMA-IR 与菌种关系分析 (B)

Fig. 5 Similarities and differences of community composition of different species at gate level (A), respectively analysis and strain relationship between area of under curve for oral glucose tolerance and HOMA-IR (B)

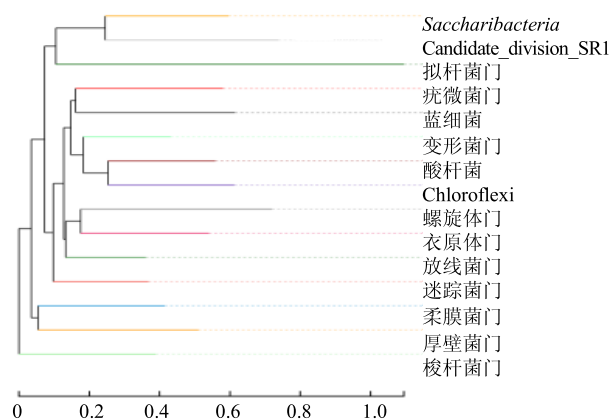


图 6 系统发育进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree

糖原异生或者促进糖酵解产生起到降血糖的作用^[1], 改善胰岛素抵抗, 且小檗碱还具有降低血清胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 等作用, 其作用机制可能是通过调节细胞外信号调节激酶 (ERK) 的活性, 转录后提高低密度脂蛋白受体 (LDLR) mRNA 的稳定性, 上调 LDLR 的表达水平^[2]或通过调节微生物的肠-脑轴来改善高脂饮食引起的代谢紊乱, 有研究证实小檗碱可改善血浆胃肠激素水平异常, 如胰高血糖素样肽 1 与 2, YY 肽、葡萄糖依赖的促胰岛素多肽和胰多肽^[3]。其在高脂血症大鼠的调脂作用中不仅与脂类、

碳水化合物和氨基酸代谢有关, 还与微生物结构的变化有关^[4-5]。据报道, 小檗碱能显著降低高脂饮食喂养的小鼠肠道中的厚壁菌门和拟杆菌的相对丰度, 增加在肠和脂肪组织脂肪因子 (FIAF) 的基因表达^[6]。小檗碱还能明显调节肠道菌群, 富集一些生产短链脂肪酸菌群提高 SCFA 水平, 有助于减轻全身炎症反应, 对胰岛素抵抗、肥胖、糖尿病和其他代谢紊乱疾病存在有益的作用^[7-8]。而且由于小檗碱入血吸收效果差, 对肠道微生物的调节作用已被假定为其抗糖尿病作用的机制之一^[9-10]。

肠道菌群存在降解酶系统, 能够利用宿主肠道不能被消化吸收的纤维或多糖, 将这些多余的多糖转化为短链脂肪酸, 部分被肠道黏膜直接利用, 部分吸收入血, 通过与脂肪细胞膜上的 G 蛋白偶联的脂肪酸受体结合, 促进游离脂肪酸和葡萄糖的吸收, 并改善胰岛素抵抗状态^[11]。高脂、高糖饮食所致肠道中双歧杆菌以及产丁酸细菌减少, 进而血液中具有抗炎和改善胰岛素抵抗的丁酸水平降低, 也可能与肥胖、胰岛素抵抗及糖尿病发生相关^[12]。肠道菌群有助于调节能量平衡, 降低代谢性疾病的发生, 如胰岛素抵抗或 2 型糖尿病。代谢的内毒素血症, 在肠促胰岛素分泌和丁酸生产的修复可以解释这些疾病与微生物的相互影响。小檗碱 (口服) 通过增加产丁酸细菌丰度修饰小鼠肠道细菌组成^[13]。

Cani 等^[14]使用氨苄西林和新霉素饲喂高脂饮食的肥胖 (ob/ob) 鼠时同样发现, 抗生素的联合使用显著地改变了肠道菌群的构成, 从而降低了动物模型中的内毒素、血糖以及糖耐量水平。

2 型糖尿病不仅与胰岛素抵抗相关, 研究还证实肠道菌群和全身慢炎症反应密切相关^[15]。肠道菌群中的革兰阴性菌的脂多糖 (LPS) 是全身慢炎症反应的始动环节, 其可引发炎症过程 CD14 与 TLR-4 的结合, 启动表达 CD14、TLR4 的免疫细胞的信号传递, 并释放炎症因子。其他最近的研究也表明抗生素对肥胖小鼠代谢异常的有益作用, 引起糖耐量降低、体质量增加、代谢性内毒素血症减少、炎症和氧化应激标志物降低^[16]。

结果表明对照组、模型组与黄连提取物组中优势菌群拟杆菌门、厚壁菌门的相对丰度都较高, 但没有明显差异, 有研究显示拟杆菌门与厚壁菌门比例可能与糖耐量成正相关^[17]。与正常人相比, CRC 患者粪便中梭杆菌属的相对丰度增加, 提示其可作为结肠肿瘤的一般特征^[18], 而在本研究中, 黄连提取物组中梭杆菌属相对于其他组相对量也升高。儿童患糖尿病患者与健康儿童相比梭杆菌属、厚壁菌门以及厚壁菌门与拟杆菌门的比都显著下降, 而拟杆菌的相对丰度显著增加^[19]。在黄连提取物组中梭杆菌门的量显著高于对照组与模型组 ($P < 0.01$), 而在儿童患糖尿病患者梭杆菌属的相对丰度显著下降, 这提示黄连提取物对儿童糖尿病患者梭杆菌属的相对丰度低的情况可能有改善作用。益生菌膳食纤维可以增加经高脂喂养的小鼠肠道中双歧杆菌的量, 经证实双歧杆菌的相对丰度与糖耐量显著正相关^[20]。在模型组中放线菌门的相对丰度有显著性差异 ($P < 0.05$), 而脱铁杆菌门只在模型组中含有, 且放线菌门与脱铁杆菌门和口服糖耐量与 HOMA-IR 的相关性都较大, 说明在经膳食联合 STZ 诱导的 2 型糖尿病中放线菌门与脱铁杆菌门可能是潜在的标志菌, 可以为临床检测标准的制定奠定基础。在黄连提取物组中未检测到的螺旋体门、柔膜菌门、脱铁杆菌门、黏胶球形菌可能对黄连比较敏感, 说明黄连提取物可能对他们起到一定的抑制作用。在本研究中还发现了厚壁菌门、螺旋体门、柔膜菌门和迷踪菌门在模型组中相对丰度高于对照组, 而给予黄连提取物后, 相对丰度有所降低, 且在黄连提取物组中变性菌门、梭杆菌门、疣微菌门的丰度略高于对照组与模型组, 提示黄连提取物可

能可以改善模型大鼠的肠道菌群紊乱。以上结果均说明在黄连提取物治疗 2 型糖尿病时, 肠道微生物的多样性发生改变, 这是黄连提取物治疗 2 型糖尿病即消渴证中肠道微生物所起作用的初步探索。

参考文献

- [1] 丁阳平, 叶小利, 周洁, 等. 小檗碱降糖作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2013, 44(6): 763-769.
- [2] Kim W S, Lee Y S, Cha S H, *et al.* Berberine improves lipid dysregulation in obesity by controlling central and peripheral AMPK activity [J]. *Amer J Physiol Endocrinol Metabol*, 2009, 296(4): E812-819.
- [3] Sun H L, Wang N J, Cang Z, *et al.* Modulation of microbiota-gut-brain axis by berberine resulting in improved metabolic status in high-fat diet-fed rats [J]. *Obes Facts*, 2016, 9(6): 365-378.
- [4] Li M, Shu X B, Xu H C, *et al.* Integrative analysis of metabolome and gut microbiota in diet-induced hyperlipidemic rats treated with berberine compounds [J]. *J Transl Med*, 2016, 14(1): 237.
- [5] Xu J H, Liu X Z, Pan W, *et al.* Berberine protects against diet-induced obesity through regulating metabolic endotoxemia and gut hormone levels [J]. *Mol Med Reports*, 1899, 15(5): 2765-2787.
- [6] Ni W J, Tang L Q, Zhou H, *et al.* Renoprotective effect of berberine via regulating the PGE2-EP1-Gαq-Ca²⁺ signalling pathway in glomerular mesangial cells of diabetic rats [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(8): 1491-1502.
- [7] Zhang X, Zhao Y, Zhang M, *et al.* Structural changes of gut microbiota during berberine-mediated prevention of obesity and insulin resistance in high-fat diet-fed rats [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42529.
- [8] 姜甜, 贾友宏, 李一石. 小檗碱调脂作用机制的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(5): 727-730.
- [9] Han J, Lin H, Huang W, *et al.* Modulating gut microbiota as an anti-diabetic mechanism of berberine [J]. *Med Sci Monit*, 2011, 17(7): 164-167.
- [10] Xie W, Gu D, Li J, Cui K, Zhang Y, *et al.* Effects and action mechanisms of berberine and *Rhizoma coptidis* on gut microbes and obesity in high-fat diet-fed C57BL/6J mice [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e24520.
- [11] Talukdar S, Olefsky J M, Osborn O. Targeting GPR120 and other fatty acid-sensing GPCRs ameliorates insulin resistance and inflammatory diseases [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2011, 32(9): 543-550.
- [12] Jakobsdottir G, Jädert C, Holm L, *et al.* Propionic and butyric acids, formed in the caecum of rats fed highly fermentable dietary fibre, are reflected in portal and aortic

- serum [J]. *Brit J Nutr*, 2013, 110(9): 1565-1572.
- [13] Wang Y, Shou J W, Li X Y, *et al.* Berberine-induced bioactive metabolites of the gut microbiota improve energy metabolism [J]. *Metabolism*, 2017, 70: 72-84.
- [14] Cani P D, Bibiloni R, Knauf C, *et al.* Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice [J]. *Diabetes*, 2008, 57(6): 1470-1481.
- [15] Wellen K E, Hotamialigil G S. Inflammation, stress and diabetes [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(5): 1111-1119.
- [16] Bechnielsen G V, Hansen C H, Hufeldt M R, *et al.* Manipulation of the gut microbiota in C57BL/6 mice changes glucose tolerance without affecting weight development and gut mucosal immunity [J]. *Res Veter Sci*, 2012, 92(3): 501-508.
- [17] Brugman S, Klatter F A, Visser J T J, *et al.* Antibiotic treatment partially protects against type 1 diabetes in the bio-breeding diabetes-prone rat. Is the gut flora involved in the development of type 1 diabetes? [J]. *Diabetologia*, 2006, 49(9): 2105-2108.
- [18] Cani P D, Neyrinck A M, Fava F, *et al.* Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improves high-fat diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxemia [J]. *Diabetologia*, 2007, 50(11): 2374-2383.
- [19] Tuohy K M, Rouzaud G C M, Bruck W M, *et al.* Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics—assessment of efficacy [J]. *Curr Pharm Des*, 2005, 11(1): 75-90.
- [20] Kostic A D, Chun E, Robertson L, *et al.* *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment [J]. *Cell Host Microb*, 2013, 14(2): 207-215.