

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.20.012

四妙衍生方对高尿酸模型大鼠肠道菌群的影响*

张光际¹, 刘剑华², 沈阳^{3△}

(1. 泰州职业技术学院医学院, 江苏 泰州 225300; 2. 江苏农牧科技职业学院动物医学院, 江苏 泰州 225300; 3. 南京医科大学医药实验动物中心, 江苏 南京 211166)

摘要:目的 研究四妙衍生方对高尿酸模型大鼠肠道菌群的影响。方法 将24只雄性SD大鼠分为正常对照组(等体积生理盐水)、模型组(等体积生理盐水)和四妙衍生方组(生药30 g/kg),各8只;喂饲高嘌呤饲料(含次黄嘌呤100 g/kg),隔日1次皮下注射氧嗪酸钾(200 mg/kg),每日1次10~12℃冷水浴10 min,连续6 d,以复制高尿酸大鼠模型,正常对照组予常规饲养;建模同时,各组大鼠灌胃相应药物或生理盐水,每日1次,连续6 d。测定大鼠血清尿酸和尿素氮水平,进行16S rRNA测序并分析大鼠直肠部位粪便菌群变化情况。结果 与模型组比较,四妙衍生方组大鼠血清尿酸、尿素氮水平均显著降低($P < 0.01$),拟杆菌门、瘤胃球菌属_UCC-014、肠球菌属、乳杆菌属丰度均显著降低($P < 0.01$),*Allobaculum*、杜氏杆菌属、瘤胃球菌属_NK4A214、罗姆布茨菌属丰度均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 四妙衍生方可降低高尿酸模型大鼠尿酸水平、改善其肠道菌群丰度。通过肠道菌群变化直接调控尿酸水平或可成为抗高尿酸中成药的研发新思路。

关键词: 四妙衍生方;高尿酸;肠道菌群;乳杆菌;肠球菌;大鼠

中图分类号:R96;R285

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)20-0045-05

Effect of Simiao Derivative Formula on the Intestinal Microflora of Model Rats with Hyperuricemia

ZHANG Guangji¹, LIU Jianhua², SHEN Yang³

(1. College of Medicine, Taizhou Polytechnic College, Taizhou, Jiangsu, China 225300; 2. College of Veterinary Medicine, Jiangsu Agri-Animal Husbandry Vocational College, Taizhou, Jiangsu, China 225300; 3. Laboratory Animal Center, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, China 211166)

Abstract: **Objective** To study the effect of Simiao Derivative Formula (SDF) on intestinal microflora in rats with hyperuricemia. **Methods** Twenty-four male SD rats were divided into the normal control group (equal volume of normal saline), model group (equal volume of normal saline) and SDF group (equivalent to 30 g/kg of crude drug), eight rats in each group. The rats were fed with high purine diet (including 100 g/kg of hypoxanthine), subcutaneously injected with potassium oxalate (200 mg/kg) once every other day, and bathed in cold water at 10-12℃ for 10 min once a day for 6 d to duplicate the model rat with hyperuricemia. The rats in the normal control group were routinely fed. At the same time of modeling, rats in each group were perfused with corresponding drugs or normal saline once a day for 6 d. The levels of uric acid and urea nitrogen in the serum of rats were measured, the 16S rRNA was sequenced, and fecal microflora in the rectum of rats was analyzed. **Results** Compared with those in the model group, the levels of serum uric acid and urea nitrogen were significantly lower ($P < 0.01$), the abundance of *Bacteroides*, *Ruminococcaceae*_UGG-014, *Enterococcus* and *Lactobacillus* was significantly lower ($P < 0.01$), while the abundance of *Allobaculum*, *Dubosiella*, *Ruminococcaceae*_NK4A214 and *Rumboutsia* was significantly higher in the SDF group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** SDF can reduce the level of uric acid and improve the abundance of intestinal flora in rats with hyperuricemia. The direct regulation of the uric acid level through the change of intestinal microflora may become a new idea for the research and development of anti-hyperuricemic Chinese patent medicine.

Key words: Simiao Derivative Formula; hyperuricemia; intestinal microflora; *Lactobacillus*; *Enterococcus*; rats

高尿酸血症是由嘌呤代谢紊乱,导致体内尿酸堆积而引起的代谢性疾病^[1],尿酸高易在体内析出结晶,沉积于肾脏、关节等处,造成痛风性肾病和痛风性关节炎,严重影响患者生活^[2],而目前临床治疗高尿酸血症方法较单一且低效^[3]。尿酸在体内超过30%通过肠道代谢,高尿酸模型大鼠肠道菌群的组成和丰度会明显

变化,且肠道菌群与糖尿病、高血脂等多种代谢性疾病的发生发展密切相关^[4-6]。四妙衍生方由黄柏、苍术、牛膝、薏苡仁、土茯苓、忍冬藤配伍而成,可有效降低机体血尿酸水平,但其作用机制尚未明晰^[7-8],可能为中药复方制剂与肠道菌群间的相互作用^[9]。本研究中通过探讨四妙衍生方、肠道菌群和高尿酸之间的关系,分析四

* 基金项目:江苏省高等学校自然科学基金面上项目[21KJD360002];江苏省高职院校青年教师企业实践培训项目[2020QYSJ064];江苏省大学生创新创业训练计划项目[202012106020Y;202112106011Y];泰州职业技术学院科研项目[TZYKYZD-19-2];泰州职业技术学院博硕基金项目[TZYBS-17-7]。

第一作者:张光际,男,硕士,讲师,研究方向为高尿酸血症与肠道菌群,(电子信箱)15861812313@163.com。

△通信作者:沈阳,女,硕士,讲师,研究方向为代谢性疾病,(电子信箱)shenyang@njmu.edu.cn。

妙衍生方对高尿酸模型大鼠肠道菌群丰度及组成的影响,阐明其抗高尿酸的作用机制,为高尿酸血症及痛风的临床治疗提供新思路。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

仪器:MR-96A型酶标仪、BS-240VET型生化分析仪,均购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司。

试剂:次黄嘌呤(上海麦克林生物科技有限公司,批号为C11157373);氧嗪酸钾(美国Sigma公司,批号为STBH8632);石蜡油(批号为G326KA4941)、羊毛脂(批号为G518BA0024),均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。黄柏饮片(江苏百草药业科技有限公司,批号为20062301);苍术饮片(批号为200216)、薏苡仁饮片(批号为200813),均购自南通三越中药饮片有限公司;牛膝饮片(江苏华洪药业科技有限公司,批号为200620);土茯苓饮片(批号为200820)、忍冬藤饮片(批号为200413),均购自苏州市天灵中药饮片有限公司。

动物:SPF级SD大鼠24只,雄性,体质量250~300 g,购自南京市江宁区青龙山动物繁殖场,实验动物生产许可证号SCXK(苏)2017-0001。适应性饲养1周。

1.2 方法

四妙衍生方的提取:四妙衍生方中按药材饮片配比混合打粉,加10倍体积的95%乙醇回流提取1次,药渣再以8倍体积的70%乙醇回流提取1次。合并2次滤液,浓缩至约2 g(生药)/mL备用。

分组、建模及给药:将24只大鼠分为正常对照组(等体积生理盐水)、模型组(等体积生理盐水)和四妙衍生方组(生药30 g/kg),各8只。后两组喂饲高嘌呤饲料(含次黄嘌呤100 g/kg),皮下注射氧嗪酸钾(200 mg/kg),隔日1次,10~12℃冷水浴10 min,每日1次,连续6 d,以复制高尿酸大鼠模型^[10],正常对照组予常规饲养;建模同时,各组大鼠灌胃相应药物或生理盐水,每日1次,连续6 d。

16S rRNA测序:末次给药2 h后,麻醉大鼠,腹主动脉取血,检测大鼠血清中尿酸和尿素氮水平;并取直肠部位新鲜粪便于EP管,-80℃保存备用。每组取4只大鼠直肠粪便样本用于测序,委托苏州金唯智生物科技有限公司完成DNA的提取、扩增、测序、质控定量、聚类分析及多样性分析。

1.3 统计学处理

采用SPSS 17.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,两组间比较行 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清尿酸和尿素氮水平

与正常对照组比较,模型组大鼠血清尿酸和尿素

氮水平均显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,四妙衍生方组大鼠血清尿酸和尿素氮水平均显著降低($P < 0.01$),表明四妙衍生方可显著改善高嘌呤喂饲导致的模型大鼠尿酸升高,同时可改善肾脏功能。详见表1。

表1 各组大鼠血清尿酸和尿素氮水平比较($\bar{X} \pm s, n = 8$)

Tab.1 Changes of serum uric acid and urea nitrogen of rats in each group ($\bar{X} \pm s, n = 8$)

组别	尿酸($\mu\text{mol/L}$)	尿素氮(mmol/L)
正常对照组	140.96 $\pm$ 30.58	6.03 $\pm$ 0.50
模型组	344.64 $\pm$ 34.19**	10.10 $\pm$ 0.43**
四妙衍生方组	247.91 $\pm$ 55.15***	5.80 $\pm$ 0.64**

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。表2至表4同。

Note:Compared with those in the normal control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;Compared with those in the model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ (for Tab.1-4).

2.2 组间指数分析

α 多样性指数:与正常对照组比较,模型组大鼠ace指数、chao1指数均显著降低($P < 0.05$),四妙衍生方组上述指标无显著差异($P > 0.05$)。shannon指数、simpson指数、覆盖度指数各组间无显著差异($P > 0.05$)。表明模型组大鼠直肠粪便中物种丰度和多样性降低,四妙衍生方给药后可有效逆转。详见表2。

表2 各组大鼠间 α 多样性指数比较($\bar{X} \pm s, n = 4$)

Tab.2 Comparison of α diversity indexes of rats in each group ($\bar{X} \pm s, n = 4$)

组别	ace指数	chao1指数	shannon指数	simpson指数	覆盖度指数
正常对照组	275.143 $\pm$ 5.678	276.124 $\pm$ 7.620	5.232 $\pm$ 0.537	0.931 $\pm$ 0.030	1.000 $\pm$ 0.001
模型组	247.254 $\pm$ 20.005*	245.183 $\pm$ 20.793*	4.915 $\pm$ 0.679	0.929 $\pm$ 0.024	1.000 $\pm$ 0.001
四妙衍生方组	261.497 $\pm$ 18.387	264.497 $\pm$ 19.328	5.421 $\pm$ 0.551	0.939 $\pm$ 0.023	1.000 $\pm$ 0.001

β 多样性指数:菌群差异NMDS分析图见图1,图中每个点代表1个样本,点与点之间的距离表示差异程度,同一组的样本使用同一形状表示。Stress < 0.146,表明NMDS可以准确反映样本间的差异程度。各组内样本相对聚集,不同组间样本存在显著差异。

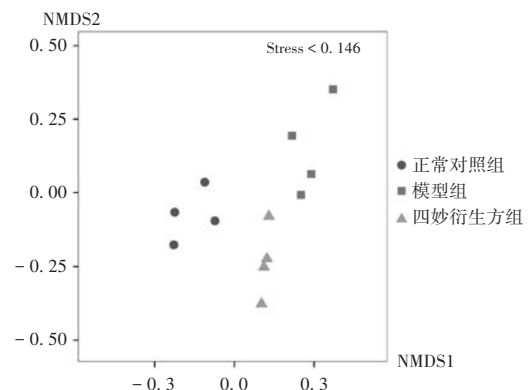


图1 菌群差异NMDS分析

Fig.1 NMDS analysis of the microflora differences

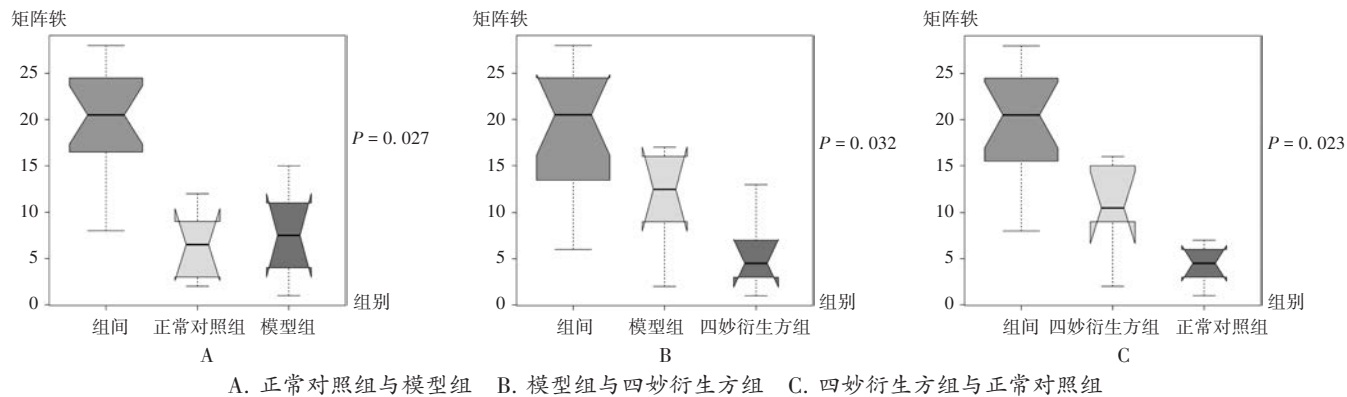


图 2 群落差异 Anosim 分析

A. Normal control group and model group B. Model group and SDF group C. SDF group and normal control group

Fig. 2 Anosim analysis of microflora differences

2.3 组间群落结构差异显著性分析

Anosim 分析结果显示,任意两组组间差异均显著大于组内差异,正常对照组与四妙衍生方组间菌群差异最显著($R = 0.927, P < 0.05$);与模型组比较,四妙衍生方组大鼠肠道菌群呈显著改变($R = 0.750, P < 0.05$)。详见图 2。

2.4 组间直肠粪便微生物变化

不同组间菌群丰度不同,正常对照组、模型组、四妙衍生方组大鼠直肠粪便中分别聚类分析出 311, 287, 292 种菌。与正常对照组比较,模型组大鼠直肠粪便肠道菌群丰度降低,菌群中放线菌门(*Actinobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、瘤胃球菌属_UCG - 014(*Ruminococcaceae_UCG - 014*)、瘤胃球菌属_1(*Ruminococcus_1*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、杜氏杆菌属(*Dubosiella*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、毛螺菌属(*Lachnoclostridium*)均丰度显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);瘤胃球菌属_NK4A214(*Ruminococcaceae_NK4A214*)、棒杆菌属(*Corynebacterium*)、罗姆布茨菌属(*Romboutsia*)丰度均显著降低($P < 0.05$)。与模型组比较,四妙衍生方组大鼠直肠粪便肠道菌群丰度增加,菌群中拟杆菌门、瘤胃球菌属_UCG - 014、肠球菌属、乳杆菌属丰度显著降低($P < 0.01$);*Allobaculum*、杜氏杆菌属、瘤胃球菌_NK4A214、罗姆布茨菌属丰度显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。详见表 3、表 4。

3 讨论

肠道菌群紊乱与多种疾病的发生发展密切相关,涉及中枢神经系统病变(如老年性痴呆、记忆力减退、抑郁、帕金森综合征)、慢性代谢性疾病(如脂肪肝、糖尿病、高血压、肥胖、骨质疏松、心血管疾病、高脂血症)、呼吸系统疾病、免疫性疾病、炎症、癌症等,肠道菌群稳态与失衡更是影响药物药效及毒副作用的重要因素^[11-17]。有研究表明,高尿酸模型大鼠肠道菌群中总

表 3 各组大鼠直肠粪便微生物门水平丰度比较($\bar{X} \pm s, n = 4$)

Tab. 3 Comparison of the abundance of rectal fecal microorganism phylum of rats in each group ($\bar{X} \pm s, n = 4$)

菌门	正常对照组	模型组	四妙衍生方组
厚壁菌门	38 565.00±512.50	39 925.50±1 230.25	37 131.00±4 864.71
放线菌门	1 826.50±744.10	643.75±325.35*	543.50±93.31***
拟杆菌门	784.00±441.30	213.00±176.77*	2 679.50±4 580.56***
变形菌门	394.75±193.78	829.75±812.24	1 084.25±442.53
酸杆菌门	23.50±14.55	144.25±145.50*	97.00±62.72*
疣微菌门	1.50±3.00	2.25±4.50	223.75±369.26**
软壁菌类	163.75±325.50	0.50±1.00	0.00±0.00

表 4 各组大鼠直肠粪便微生物属水平丰度比较($\bar{X} \pm s, n = 4$)

Tab. 4 Comparison of the abundance of rectal fecal microorganism genus of rats in each group ($\bar{X} \pm s, n = 4$)

菌属	正常对照组	模型组	四妙衍生方组
瘤胃球菌_UCG - 014	0.00±0.00	728.75±816.89**	44.25±31.70**
瘤胃球菌_1	1.25±1.26	915.50±647.91*	799.75±383.95**
<i>Allobaculum</i>	4.25±3.86	79.50±64.24	1 723.75±614.09***
肠球菌	4.75±1.89	3 060.50±1 175.90**	803.50±119.92***
杜氏杆菌	5.75±7.32	147.25±102.58*	2 427.00±1 369.78**
乳杆菌	32.75±57.52	4 628.75±1 758.30**	610.25±175.54***
毛螺菌	198.50±132.47	698.00±187.35**	642.75±606.84
瘤胃球菌_NK4A214	234.00±99.96	59.00±52.02*	322.25±168.95*
棒杆菌	1 482.50±832.16	155.25±163.20*	140.00±148.18*
罗姆布茨菌	5 126.25±1 164.73	2 943.00±649.77*	5 648.75±854.75**

需氧菌、大肠埃希菌、拟杆菌丰度升高,乳酸菌、双歧杆菌丰度降低^[18];痛风患者肠道粪拟杆菌、解木聚糖拟杆菌丰度升高,柔嫩梭菌、双歧杆菌、梭菌丰度降低^[19-20],肠道微生物组成对高尿酸血症的发生发展具有显著影响。本研究中采用次黄嘌呤饲料联合氧嗪酸钾复制高尿酸大鼠模型,探讨模型大鼠直肠粪便肠道菌群组成特点,证实了其体内菌群丰度变化总趋势与以往报道结论相似。但本研究结果中肠球菌、乳杆菌、

棒杆菌丰度的变化趋势与以往研究结论有所不同,考虑为次黄嘌呤摄入对大鼠肠道菌群的影响。四妙衍生方可通过改变肠道菌群组成,改善肠道菌群失衡,减少肠道损伤,以及尿酸的生成和吸收,增加体内尿酸排泄,发挥抗高尿酸血症的作用。

肠道菌群丰度影响肠道稳态,厚壁菌门(*Firmicute*, F)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*, B)是肠道菌群中的优势菌群,两门相对丰度比值(F/B值)为判断肠道菌群紊乱的重要指标^[21],高尿酸模型大鼠肠道F/B明显升高^[22]。本研究结果表明,正常对照组大鼠直肠粪便菌群多样性更好,模型组大鼠粪便菌群多样性降低,四妙衍生方组大鼠粪便菌群丰度升高。与正常对照组比较,模型组大鼠血清尿酸水平升高,放线菌门、拟杆菌门丰度均显著升高。四妙衍生方组大鼠粪便拟杆菌门丰度显著降低。正常对照组、模型组、四妙衍生方组的F/B值分别为49.25, 186.56, 13.86,表明四妙衍生方可有效改善高尿酸对大鼠肠道菌群稳态的破坏。属水平下菌群变化以瘤胃球菌、*Allobaculum*、肠球菌、杜氏杆菌、乳杆菌、毛螺菌、棒杆菌、罗姆布茨菌属丰度变化较显著。正常对照组大鼠直肠粪便中瘤胃球菌属_NK4A214、棒杆菌、罗姆布茨菌丰度较高,这些菌群通过产生外毒素、拮抗营养物质、维持肠道菌群平衡等作用维持机体正常状态。模型组大鼠直肠粪便中肠球菌、乳杆菌、毛螺菌丰度升高,乳杆菌可促进能量物质吸收,毛螺菌促进炎症发生发展,肠球菌促进炎症产生、释放超氧化物、破坏DNA结构,菌群中链球菌通过产生链道酶分解DNA,产生的黄嘌呤进一步被氧化成尿酸,在粪杆菌、肠球菌、毛螺菌、乳杆菌的共同作用下引发炎症、促进尿酸吸收,考虑为增加血清尿酸水平的有害菌群。与模型组比较,四妙衍生方组大鼠血清尿酸水平降低,给药后瘤胃球菌属_UCG-014、肠球菌、乳杆菌数量减少,*Allobaculum*、杜氏杆菌、瘤胃球菌属_NK4A214、罗姆布茨菌丰度显著升高,考虑为四妙衍生方可通过调节肠道菌群发挥抗炎、调免疫、稳定肠壁的作用,进而减少尿酸生成与吸收,降低血清尿酸水平。促进尿酸吸收和生成的有害菌群减少,可能是四妙衍生方抗高尿酸作用的关键。

四妙衍生方中黄柏^[23]、土茯苓^[24]可通过降低肠道菌群F/B值,调节高尿酸模型大鼠的肠道菌群结构,稳定肠道菌群,改善肠道健康。苍术^[25]、牛膝^[26]、薏苡仁^[27]可通过促进肠道双歧杆菌、乳酸菌的生长,同时抑制大肠杆菌、肠球菌、肠杆菌的生长,可抑制炎症因子产生、减轻炎症浸润,又可改善肠道菌群失衡、减轻肠道黏膜结构破坏,保护肠道。黄柏^[23]、薏苡仁^[27]具有抑制肠球菌的作用,减少炎症因子和超氧化物的释放,保护肠道

健康。忍冬藤^[28-29]具有抑制炎症因子产生、减轻炎症反应的作用,可改善肾功能,增加尿酸的肾排出量。

综上所述,四妙衍生方可降低高尿酸模型大鼠尿酸水平、改善其肠道菌群丰度。通过肠道菌群变化直接调控尿酸水平或可成为抗高尿酸中成药的研发新思路。

参考文献

- [1] 倪青. 高尿酸血症和痛风病证结合诊疗指南[J]. 世界中医药, 2021, 16(2): 183-189.
- [2] 李春胜, 李卫东, 刘燕, 等. 非布司他治疗G3期慢性肾脏病伴无症状高尿酸血症的临床效果及对患者肾功能的保护作用[J]. 中国临床药学杂志, 2021, 30(1): 1-4.
- [3] 何曦萌, 徐黎青, 朱春霖, 等. 次黄嘌呤联合氧嗪酸钾构建高尿酸血症小鼠模型探讨[J]. 医学理论与实践, 2021, 34(4): 541-543.
- [4] 董文学, 蒋雅琼, 马利锋, 等. 肠道菌群对尿酸代谢的影响[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2021, 30(1): 55-59.
- [5] 李雅楠, 侯云霞, 李鸿斌. 肠道菌群与尿酸相关性疾病的研究进展[J]. 临床荟萃, 2021, 36(1): 80-83.
- [6] 张奎, 邓向亮, 傅南琳. 肠道菌群与痛风性关节炎的研究进展[J]. 广东药科大学学报, 2020, 36(6): 903-906.
- [7] 潘红英, 时乐, 徐立, 等. 加味四妙丸有效部位群抗高尿酸血症作用及其机制[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2014, 28(3): 380-385.
- [8] 曾宛平, 尹莲, 时乐, 等. 加味四妙方抗高尿酸血症及痛风性关节炎药效学分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(13): 129-133.
- [9] 杨志华, 邓柳颐, 李冬梅, 等. 中药复方对肠道微生态调节作用的研究[J]. 西部中医药, 2020, 33(9): 166-168.
- [10] 时乐, 徐立, 尹莲, 等. 冷水泳浴对高尿酸血症模型大鼠诱发痛风性关节炎的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(1): 25-29.
- [11] PETERSON CT, SHARMA V, ELMÉN L, et al. Immune homeostasis, dysbiosis and therapeutic modulation of the gut microbiota[J]. Clin Exp Immunol, 2015, 179(3): 363-377.
- [12] WEN L, LEY RE, VOLCHKOV PY, et al. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes[J]. Nature, 2008, 455(7216): 1109-1113.
- [13] ZHAO QQ, SHEN YB, DONG FL, et al. The relationship between uric acid metabolism and the composition of intestinal flora in patients with coronary artery disease[J]. Journal of Pathogen Biology, 2018, 13(5): 524-527.
- [14] YAN X, JIN J, SU X, et al. Intestinal flora modulates blood pressure by regulating the synthesis of intestinal-derived corticosterone in high salt-induced hypertension[J]. Circ Res, 2020, 126(7): 839-853.
- [15] STAFFAS A, BURGOS SM, SLINGERLAND AE, et al. Nutritional support from the intestinal microbiota improves hematopoietic reconstitution after bone marrow transplantation in mice[J]. Cell Host Microbe, 2018, 23(4): 447-457.
- [16] STEWART CJ, AJAMI NJ, O'BRIEN JL, et al. Temporal