嗜黏蛋白阿克曼菌及Amuc_1100对高脂饮食联合 链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠的保护作用^{*}

邓思思¹, 陈 静¹, 刘 雪¹, 董新燕^{1,2}, 张翔凌¹, 王国庆¹△ 1.四川大学华西公共卫生学院/华西第四医院卫生检验与检疫系(成都 610041); 2. 石家庄市疾病预防控制中心(石家庄 050000)

【摘要】目的 探究嗜黏蛋白阿克曼菌活菌、巴氏灭活菌及Amuc_1100蛋白干预对高脂饮食联合链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ)诱导的糖尿病大鼠的预防保护作用。方法 将96只SD大鼠随机分成8组,包括6组实验组和2组对照 组,每组12只。采用高脂饲料喂养联合STZ注射模拟大鼠2型糖尿病进展。同时用不同剂量的嗜黏蛋白阿克曼菌活菌、巴氏灭活菌及Amuc_1100蛋白灌胃干预8周。收集大鼠血浆样本测定脂质和葡萄糖代谢、炎症相关指标因子,收集结肠组织 样本进行HE染色。收集大鼠粪便样本进行16S rRNA基因测序。结果 与高脂饮食对照组相比,嗜黏蛋白阿克曼菌干预 组大鼠体质量增加减少(P<0.01)、血浆肿瘤坏死因子-α水平降低(P<0.05);嗜黏蛋白阿克曼菌或Amuc_1100干预可导致杯 状细胞数量和黏蛋白分泌增加。各干预组样本β多样性分析显示总体上无差异。结论 口服嗜黏蛋白阿克曼菌可以有效 减轻高脂饮食引起的代谢紊乱,包括体质量增加和全身炎症等。嗜黏蛋白阿克曼菌及Amuc_1100干预对改善肠道屏障功 能具有一定作用,干预8周后对肠道菌群结构没有明显影响。

【关键词】 嗜黏蛋白阿克曼菌 糖尿病 肠道屏障 肠道菌群

Protective Effects of Akkermansia muciniphila and Amuc_1100 Protein on Rats on High-Fat Diet Combined with Streptozotocin Injection DENG Si-si¹, CHEN Jing¹, LIU Xue¹, DONG Xin-yan^{1,2}, ZHANG Xiang-ling¹, WANG Guo $qing^{1\Delta}$. 1. Department of Public Health Laboratory Sciences, West China School of Public Health/West China Fourth Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Shijiazhuang Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shijiazhuang 050000, China

 \triangle Corresponding author, E-mail: huaxiwgq@163.com

[Abstract] Objective To explore the protective effects of live or pasteurized Akkermansia muciniphila and Amuc_1100 protein on a rat model of diabetes mellitus induced by high-fat diet (HFD) combined with streptozotocin (STZ). Methods A total of 96 Sprague-Dawley (SD) rats were randomly assigned to 8 groups, including 6 experimental groups and 2 control groups, with 12 rats in each group. HFD combined with STZ injection was given to the rats to create a simulated model of the progression of diabetes mellitus type 2. In addition, the rats were treated with different doses of live or pasteurized Akkermansia muciniphila or Amuc_1100 protein by way of gavage for 8 weeks simultaneously. Plasma samples were collected to determine the level of parameters related to lipid and glucose metabolism, and inflammation mediators. Colon tissue specimens were collected for HE staining. Stool samples of the rats were collected for 16S rRNA gene sequencing. Results Compared with the HFD control group, rats in the group treated with Akkermansia muciniphila exhibited significantly lower body mass gain (P<0.01) and lower plasma TNF- α level (P<0.05). Administration of Akkermansia muciniphila or Amuc_1100 protein increased the number of goblet cells and mucin secretion. The β diversity analysis of the samples showed no overall difference in the intervention groups. Conclusion Oral administration of Akkermansia muciniphila can effectively ameliorate HFD-induced metabolic disorders, including body mass gain and systemic inflammation. Akkermansia muciniphila and Amuc_1100, to a certain degree, improved the gut barrier function. After eight weeks of intervention, there was no significant impact on the structure of the gut microbiota.

(Key words) Akkermansia muciniphila Diabetes mellitus Gut barrier Gut microbiota

嗜黏蛋白阿克曼菌(Akkermansia muciniphila,即A. muciniphila,下文简称Akk),是一种卵圆形的革兰阴性厌 氧菌,约占人类肠道微生物的1%~5%^[1]。DERRIEN等^[2]于2004年首次分离出可降解黏蛋白的菌株MucT,其能利 用肠道黏液作为唯一的碳源、氮源及能量来源。研究表

明, Akk与肥胖、糖尿病、肝脏和心血管疾病等的发生发 展相关, 在调节机体代谢紊乱方面发挥着至关重要的作 用^[3-5]。Amuc_1100是一种来自Akk的菌毛样蛋白^[6]。作 为该菌最丰富的外膜蛋白之一, 可能参与其和宿主及其 他微生物之间的相互作用。研究表明, Amuc_1100可通 过Toll样受体2(Toll-like receptor 2, TLR2)信号通路介导 Akk与宿主的相互作用, 在一定程度上能够解释该菌对肥

* 四川省科技厅重点研发项目(No. 2019YFS0304)资助

[△] 通信作者, E-mail: huaxiwgq@163.com

胖、胰岛素抵抗和肠道屏障的影响^[3]。

肥胖和2型糖尿病(diabetes mellitus type 2, T2DM)是 一类伴随着炎症反应、肠道菌群结构改变和肠道屏障破 坏的代谢性疾病^[7]。高脂饮食小鼠或瘦素缺乏小鼠的粪 便样本中检测到Akk丰度显著低于相应对照组小鼠^[8]。 与葡萄糖耐量正常个体相比,在诊断为糖尿病前期的个 体粪便样本中检测到Akk丰度显著降低,表明肠道中 Akk丰度变化与糖尿病的发生相关^[9]。链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ)可促进分泌胰岛素的胰岛B细胞的 选择性损伤。CHAO等^[10]通过高脂饮食联合STZ注射,建 立了T2DM动物模型。目前对于Akk在影响肠道生理功 能及特定代谢紊乱疾病方面发挥的具体作用及其作用机 制仍知之甚少。本研究拟探究Akk和Amuc_1100蛋白对 高脂饲料喂养联合STZ注射模拟T2DM进展的大鼠脂代 谢、葡萄糖稳态、炎症反应、肠道屏障功能和肠道菌群结 构的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和蛋白 实验所用嗜黏蛋白阿克曼菌菌株 (DSM 22959)由南京农业大学食品科学与技术学院刘丽 教授惠赠。重组Amuc_1100蛋白由本课题组前期制备并 保存^[11]。

1.1.2 主要试剂 脑心浸液(BHI)肉汤培养基(北京陆桥); 三酰甘油、总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇测定试剂盒(南京建成生物科技有限公司); 酶联免疫吸附测定试剂盒(上海酶联生物科技有限公司); ACCU-CHEK*便携式血糖计(罗氏公司)。

1.1.3 实验动物 96只6~8周龄、体质量(180±20)g的健 康雄性SD大鼠购自成都达硕实验动物中心(批准号: SCXK2018-011)。饲养于室温(21±2)℃,光照周期12 h/ 12 h。大鼠3 d适应期间保持正常饮食,适应期后开始实 验干预。实验期间分别喂养普通饲料或高脂饲料(66% 普通饲料添加62%蔗糖,10%猪油,2.5%胆固醇,1.5%猪胆 酸盐),饲料均购自成都达硕实验动物有限公司。动物实 验按照我国《实验动物福利伦理审查指南(GB/T 35892-2018)》要求,规范落实实验动物福利伦理。

1.2 方法

1.2.1 嗜黏蛋白阿克曼菌的培养及巴氏灭活菌制备 将 细菌接种在含有1.5%半胱氨酸的BHI肉汤培养基中厌氧 培养。BHI琼脂平板计数。无菌PBS收集细菌,将菌悬液 浓度调整至1×10°CFU/mL或1×10¹⁰CFU/mL,取部分菌悬液于 70℃热灭活30 min,用体积分数25%的甘油将细菌冻存 于-80 ℃。使用前将保存的甘油菌解冻,用无菌PBS稀释 10倍,使其终浓度为1×10⁷ CFU/mL或1×10⁹ CFU/mL,甘油 体积分数为2.5%。

1.2.2 实验动物分组及处理 将96只大鼠随机分成8组, 每组各12只。6组实验组大鼠每天进行一次灌胃处理,每 次灌胃0.5 mL: A组,高剂量活菌组(HFD live Akk, 5× 10⁸ CFU); B组,低剂量活菌组(HFD live Akk, 5× 10⁶ CFU); C组,高剂量灭活菌组(HFD pasteurized Akk, 5×10⁸ CFU); D组,低剂量灭活菌组(HFD pasteurized Akk, 5×10⁶ CFU); E组,高剂量蛋白组,用6 μg重组Amuc_1100 蛋白灌胃; F组,低剂量蛋白组,用3 μg重组Amuc_1100蛋 白灌胃。对照组分为: I组,正常饮食组(ND); G组,高脂 饮食组(high-fat diet, HFD)。在持续8周的处理中,实验 组大鼠均以高脂饲料喂养。正常饮食组大鼠喂养普通饲 料且不接受处理,高脂饮食组喂养高脂饲料并灌胃0.5 mL 含有体积分数2.5%甘油的无菌PBS。

实验期间每周测量一次大鼠体质量,每两周测定一次血糖水平。在实验第9周的第一天,除正常饮食组外, 其余组大鼠按30 mg/kg体质量的剂量腹腔注射STZ。 STZ注射5 d后,大鼠禁食12 h,测量血糖水平后处死。空 腹血糖≥11.1 mmol/L为T2DM大鼠成模标准。在注射 STZ前一天和处死前一天各测量一次大鼠体质量。

1.2.3 标本收集 在注射STZ前一天和处死前一天分别 采集新鲜粪便样本于无菌收集管中,-20℃储存以便进 一步分析。采集禁食12h后的大鼠下腔静脉血于含有 EDTA抗凝剂的真空收集管,3000r/min离心10min,收集 血浆储存于-80℃待进一步分析。解剖大鼠,取大鼠结 肠部分,PBS冲洗后固定保存在卡诺氏液中。

1.2.4 血浆分析 通过试剂盒检测脂代谢相关因子水 平,包括三酰甘油、总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇。 ELISA法测定葡萄糖代谢相关因子水平,包括空腹血浆胰 岛素和葡萄糖-6-磷酸酶(G6P);测量相关炎症因子肿瘤 坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-6(IL-6)和C-反应蛋白 (CRP)的水平。

1.2.5 组织学分析 收集大鼠结肠组织,冲洗管腔内容物,在卡诺氏溶液中固定。经石蜡包埋、切片后HE染色,中性树胶封片。于光学显微镜下观察分析杯状细胞和黏液层的变化。

1.2.6 16SrRNA测序 从粪便样本中提取DNA,随机选取40个DNA样本(每组5个)进行16SrRNA(V3-V4高变区)基因测序。测序由华银生物技术公司进行。

1.2.7 统计学方法 数据经正态性检验后以*ī*±*s*表示。正态分布资料且经Levene检验判断方差齐,采用ANOVA

分析和SNK检验进行组间比较;方差不齐或非正态分布资料则进行Kruskal-Wallis检验。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠的一般情况

实验过程中共5只(C组1只,G组4只)大鼠死亡,其余 91只大鼠精神状态良好。与正常饮食对照组相比,STZ注射 后高脂饮食对照组大鼠空腹血糖水平均≥11.1 mmol/L

(图1),表示能成功模拟T2DM的发生。

2.2 嗜黏蛋白阿克曼菌和重组Amuc_1100干预对脂代谢 相关因子的影响

与高脂饮食对照组相比,正常饮食对照组大鼠血浆 样本中三酰甘油、总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇水平 均较低,两组间仅血浆总胆固醇水平差异有统计学意义 (*P*<0.05)。各干预组的脂代谢相关因子水平与高脂饮食 对照组相比差异均无统计学意义(表1)。



图 1 大鼠的存活情况及嗜黏蛋白阿克曼菌干预对高脂饮食大鼠体质量和葡萄糖稳态的影响 Fig 1 The survival of rats and the effect of Akk intervention on body mass gain and glucose homeostasis of SD rats on HFD

A: High-fat diet (HFD) live Akk, 5×10^8 CFU (n=12); B: HFD live Akk, 5×10^6 CFU (n=12); C: HFD pasteurized Akk, 5×10^8 CFU (n=11); D: HFD pasteurized Akk, 5×10^6 CFU (n=12); E: 6 µg Amuc_1100 protein (n=12); F: 3 µg Amuc_1100 protein (n=12). I: Normal diet (n=12); G: HFD (n=8). BM: Body mass; FBG: Fasting blood-glucose; G6P: Glucose-6-phosphatase. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001.

农I 加代闭西了两重数站分析结本							
Table 1	1 Data analysis findings on lipid metabolism parameters						
Group	Triglrcerides/ (mmol/L)	Total cholesterol/ (mmol/L)	Low-density lipoprotein cholesterol/(mmol/L)				
A (n=12)	0.80±0.50	6.59±4.12	1.97±1.20				
B (<i>n</i> =12)	0.76±0.37	7.35±2.53	2.48±0.61				
C (n=11)	1.37±0.59	7.27±2.55	2.60±0.79				
D (<i>n</i> =12)	0.79±0.34	6.48±2.02	2.30±0.85				
E (<i>n</i> =12)	0.56±0.48	5.38±2.09	1.83±0.64				
F (<i>n</i> =12)	0.96±0.86	5.84±3.95	2.27±1.30				
I (<i>n</i> =12)	0.71±0.25	2.66±0.57*	1.40 ± 0.54				
G (<i>n</i> =8)	0.95±0.73	6.62±5.10	2.08±1.48				

吃少湖田了测旱粉捉八托娃田

A-F, I, G: Same notes of Fig 1. * P<0.05, vs. G group.

2.3 嗜黏蛋白阿克曼菌干预对大鼠体质量和葡萄糖稳态 的影响

见图1。大鼠在维持8周高脂饮食后注射STZ,相较于 正常饮食对照组,STZ注射后高脂饮食对照组大鼠的体质 量下降明显(P<0.001),空腹血糖水平也升高(P<0.001), 说明高脂饮食喂养联合STZ注射诱发了大鼠T2DM。

STZ注射前,与高脂饮食对照组相比,低剂量活菌或 高剂量巴氏灭活菌干预组大鼠体质量增加减少(P< 0.01)。STZ注射后,除正常饮食对照组外,各组大鼠体质 量均减轻。仅高剂量活菌干预可抑制体质量减轻,而在 其他干预组中均未观察到该现象。见图1。

在大鼠处死前测量空腹血糖。高脂饮食对照组大鼠 的空腹血糖水平高于正常饮食对照组(P<0.001)。高剂 量活菌干预组的空腹血糖水平低于高脂饮食对照组(P< 0.05); 而其他干预组中没有观察到该现象。与高脂饮食 对照组相比, 各个干预组的血浆胰岛素水平都降低(P< 0.05), 且正常饮食对照组大鼠的胰岛素水平远低于高脂 饮食对照组(P<0.001)。针对血浆G6P这一指标, 仅高剂 量活菌干预组的水平较高剂量巴氏灭活菌干预组低 (P<0.05)。见图1。

2.4 嗜黏蛋白阿克曼菌干预对炎症因子的影响

见图2。对照组中,高脂饮食组大鼠血浆TNF-α和 CRP水平显著升高(P<0.001)。Akk活菌或巴氏灭活菌干 预可导致TNF-α水平显著降低,高剂量活菌干预效果较 低剂量活菌和高剂量巴氏灭活菌更强(P<0.05)。低剂量 活菌干预导致血浆CRP水平显著下降(P<0.01)。与高脂 饮食对照组相比,Akk活菌或巴氏灭活菌干预会导致血浆 IL-6水平下降;其中低剂量活菌干预组和高剂量巴氏灭 活菌干预组与高脂饮食对照组比较差异有统计学意义(P< 0.05)。

2.5 重组Amuc_1100干预对大鼠体质量和葡萄糖稳态的影响

见图3。Amuc_1100蛋白干预组8周的高脂饮食并未 导致大鼠体质量增加。与正常饮食对照组相比,注射 STZ后,高脂饮食对照组体质量减少(P<0.001)。而相较 于高脂饮食对照组,Amuc_1100蛋白干预组的体质量减 少差异无统计学意义。

见图3。与高脂饮食对照组相比,Amuc_1100蛋白的 干预对空腹血糖水平没有影响。然而,低剂量蛋白干预 组的血浆胰岛素水平有所降低(P<0.05)。高剂量蛋白干 预会导致血浆G6P水平的增加(P<0.05)。

2.6 重组Amuc_1100干预对炎症因子的影响

见图4。相较于高脂饮食对照组, Amuc_1100干预可



图 2 嗜黏蛋白阿克曼菌干预对高脂饮食大鼠炎症因子的影响



A-D, I, G: Same notes of Fig 1; TNF-a: Tumor necrosis factor-a; IL-6: Interleukin-6; CRP: C-reactive protein. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001.



图 3 Amuc_1100干预对高脂饮食大鼠体质量和葡萄糖稳态的影响

Fig 3 Effect of Amuc_1100 protein intervention on the body weight and glucose homeostasis of SD rats on HFD

E, F, I, G: Same notes of Fig 1; BM, FBG and G6P denote the same as those in Fig 1. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001.

导致血浆TNF-a水平降低(P<0.001)。高剂量蛋白干预 组大鼠血浆TNF-a水平低于低剂量蛋白干预组(P<0.05)。 而各组间血浆IL-6水平无明显变化(P>0.05)。与高脂饮 食对照组相比, Amuc_1100蛋白干预会导致血浆CRP的 降低, 但差异无统计学意义。

2.7 嗜黏蛋白阿克曼菌或重组Amuc_1100干预对肠道黏 液层的影响

正常饮食对照组大鼠中可观察到较多的杯状细胞和 黏蛋白分泌。相较于高脂饮食对照组,Akk活菌或巴氏灭 活菌干预组中大鼠回盲肠组织中的杯状细胞密度更高 (图5)。相较于高脂饮食对照组, Amuc_1100蛋白的干预 可增强大鼠结肠组织黏蛋白分泌和黏液层厚度(图6)。

2.8 肠道菌群16S rRNA基因测序结果

通过物种累积曲线可以判断出样本量充分,可进行 下一步分析(图7a)。按97%一致性将序列聚类为OTUs, 绘制OTU Rank曲线用于展示样本的物种多样性及物种 丰富度和均匀性。样本结果显示出不同的曲线趋势和等 级长度(图7b),整体而言,正常饮食对照组的OTU数目最 丰富,均匀程度最高。图7c显示,蛋白干预组包含的单独 OTU数比Akk活菌和巴氏灭活菌干预组的少。



图 4 Amuc_1100干预对高脂饮食大鼠炎症因子的影响 Fig 4 Effect of Amuc_1100 protein intervention on the inflammation status of SD rats on HFD E, F, I, G: Same notes of Fig 1; TNF-α, IL-6 and CRP denote the same as those in Fig 2. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001.



图 5 嗜黏蛋白阿克曼菌干预高脂饮食大鼠结肠组织切片观察。HE ×400 Fig 5 Histologic analysis of the colon tissue of HFD rats given Akk intervention. HE ×400

A-D, I, G: Same notes of Fig 1.



图 6 Amuc_1100干预高脂饮食大鼠结肠组织切片观察。HE ×400

Fig 6 Histologic analysis of the colon tissue of HFD rats given Amuc_1100 intervention. HE ×400



Fig 7 Results of OTU analysis

A-F, I, G: Same notes of Fig 1; a: Species accumulation curves; b: OTU rank curve; c: Venn diagram of OTU number.

此外,我们通过Shannon、Simpson和ACE指数评估 样本a多样性。Shannon和ACE指数结果显示,正常饮食 对照组比高脂饮食对照组a多样性水平高(P<0.05, P< 0.01),同时Simpson指数较低(P<0.05,表2)。C组和E组 样本有较低的Shannon指数和较高的Simpson指数。然而 仅E组的Shannon指数与高脂饮食对照组相比差异有统计 学意义(P<0.05,表2)。

表 2 α多样性指数分析 Table 2 Analysis of alpha diversity index

Group	ACE	Shannon	Simpson
A (n=12)	2249.96±595.32	4.65±0.33	0.03±0.01
B (<i>n</i> =12)	2784.96±295.82	4.60±0.23	0.04 ± 0.01
C (<i>n</i> =11)	2171.07±934.92	4.13±0.87	0.06 ± 0.04
D (<i>n</i> =12)	2374.32±318.72	4.50 ± 0.54	0.04±0.02
E (<i>n</i> =12)	1235.38±726.37	3.90±0.59*	0.05±0.22
F (<i>n</i> =12)	2212.38±1107.83	4.55±0.73	0.04 ± 0.04
I (<i>n</i> =12)	3173.88±71.65**	5.45±0.17*	0.02±0.01*
G (<i>n</i> =8)	1948.94±695.07	4.63±0.44	0.03±0.01

A-F, I, G: Same notes of Fig 1. * *P*<0.05, ** *P*<0.01, vs. G group.

聚类热图展示了样本β多样性水平(图8)。聚类结果显示样本间有较大程度的个体变异。Adonis多元方差分析和Anosim相似性分析揭示了不同剂量蛋白干预组之间的显著差异(P<0.05)。与高脂饮食对照组相比,仅正常饮食对照组差异有统计学意义(P<0.05)。MRPP分析结果一致(P<0.05)。

图9显示了门水平上肠道菌群的组成分类,可看到与 肥胖相关的厚壁菌门/拟杆菌门的组成比例在各组中存 在差别, B、C、D、E组中厚壁菌门/拟杆菌门的比例相对 降低。在C、D、E组样本中可观察到与结直肠癌联系紧 密的梭杆菌门丰度较高。

3 讨论

近期几项啮齿动物和人类研究阐明了Akk对宿主脂 代谢的调节作用^[12-13]。本研究显示,持续8周高脂饮食处 理导致大鼠血浆总胆固醇、三酰甘油和低密度脂蛋白胆 固醇水平有所增加,与正常饮食对照组相比,后两者的增 加并无统计学意义。且在高脂饮食条件下,Akk或Amuc_ 1100蛋白干预对脂代谢相关因子水平的变化无明显影响。

高脂饮食联合STZ注射常用于模拟啮齿动物非自发 性T2DM的发生^[14]。注射STZ 5 d后,本研究发现高剂量巴 氏灭活菌干预组1只大鼠死亡, 而高脂饮食对照组4只大 鼠死亡。我们推测这种死亡可由多种因素引发,其一为 STZ给药导致的器官毒性。本实验中大鼠在高脂饮食条 件下可发生胰岛素抵抗,结合STZ注射可促进胰岛B细胞 的选择性损伤,但胰岛B细胞的快速破坏可导致胰岛素缺 乏和高血糖症,血糖迅速升高,造成大鼠可能因酮症酸中 毒死亡^[15-16]。而Akk活菌或巴氏灭活菌干预可以减轻 STZ的影响并减少大鼠死亡。STZ注射前,低剂量活菌或 高剂量巴氏灭活菌干预可减轻高脂饮食导致的体质量增 加。而仅高剂量活菌干预可有效抑制STZ注射引起的体 质量减少。值得注意的是,本研究发现高脂饮食组和正 常饮食对照组的体质量增加无明显差异。根据相关研究 猜测可能原因为高脂饲料口感不佳导致大鼠食物摄入量 较低^[3]。

高脂饮食和STZ给药可能会引起胰岛素抵抗、促进 糖异生过程。为确认Akk的干预效果,本研究测定了大鼠 血浆空腹血糖、胰岛素和G6P水平。高脂饮食对照组大 鼠胰岛素水平相对较高,可能是由于连续高脂饮食导致 空腹血糖水平升高,出现胰岛素代偿性分泌。高剂量活 菌干预组可导致高脂饮食大鼠空腹血糖和代偿性分泌的 胰岛素水平显著降低。而另外3组Akk干预虽然导致高脂



图 8 β多样性聚类热图

Fig 8 Heatmap of beta diversity based on weighted_unifrac of all samples



图 9 门水平上的肠道菌群分类组成

Fig 9 Taxonomy composition of gut microbiota at the phylum level

A-G, I: Same notes of Fig 1; a: Group level; b: Sample level.

饮食大鼠胰岛素水平显著降低,但空腹血糖水平仍较高, 可能是由于部分大鼠表现出较强的胰岛素抵抗,促进糖 异生,从而导致大鼠空腹血糖水平组内差异较大。G6P 是一种限速酶,可催化6-磷酸葡萄糖水解为葡萄糖¹¹⁷,是 参与糖异生过程的关键酶之一。与高脂饮食对照组相 比,总体上各干预组G6P水平没有显著变化。然而,与高 剂量巴氏灭活菌干预组相比,高剂量活菌干预组的血浆 G6P和空腹血糖水平均较低,推测可能是活菌干预抑制 了糖异生,通过改善胰岛素抵抗来降低空腹血糖水平,而 巴氏灭活菌干预未能有效抑制糖异生,因而表现出较高 的空腹血糖水平。综上所述,本研究结果表明,Akk可能 会通过抑制胰岛素分泌、改善胰岛素抵抗来发挥作用,高 剂量活菌干预可在一定程度上缓解大鼠在高脂饮食和 STZ给药时表现出的葡萄糖代谢失调。

炎症介质在胰岛素抵抗和T2DM的发展过程中起着 关键作用^[18]。TNF-α能够通过葡萄糖转运蛋白-4(GLUT4) 的减少和NF-κB的激活导致胰岛B细胞功能受损^[19]。本研 究发现,Akk活菌或巴氏灭活菌干预会导致血浆TNF-α水 平降低,其中高剂量活菌干预效果更加明显。CRP是另 一种炎症相关因子。高脂饮食导致大鼠血浆CRP水平升 高,低剂量活菌干预可显著降低血浆CRP水平。虽然未 观察到显著差异,但整体上Akk干预组的血浆CRP水平均 有所降低。以上分析表明口服Akk可以减轻高脂饮食引 起的全身炎症反应,与之前报道一致^[5,20]。

本研究发现无论注射STZ与否,Amuc_1100干预对高 脂饮食大鼠体质量变化均无明显影响。PLOVIER等¹³报 道在Amuc_1100蛋白干预5周后可减缓小鼠整体体质量 增加趋势,但本结果无法证实这一点。造成差异的可能 原因是PLOVIER等在他们的研究中使用的小鼠,而本次 研究对象为大鼠。研究发现,与高脂饮食对照组相比, Amuc_1100干预对大鼠空腹血糖水平没有影响。低剂量 蛋白干预可显著降低高脂饮食导致的胰岛素升高,高剂 量蛋白干预会导致血浆G6P水平的增加,说明Amuc_1100 蛋白可能对改善高脂饮食相关代谢紊乱有一定影响。尽 管Amuc_1100干预组大鼠血浆IL-6和CRP的变化没有显 著差异,但Amuc_1100蛋白干预后血浆TNF-a水平显著低 于高脂饮食对照组。因此,Amuc_1100蛋白可能具有一 定的抗炎作用,仍需进一步探究。

肠道屏障是人体最广泛、最重要的屏障之一。它由 共生微生物、肠上皮细胞和黏液层组成^[21]。黏液层主要 由MUC2黏蛋白形成,它是一种由杯状细胞分泌的糖蛋 白^[22]。Muc2缺陷可影响小鼠肠黏膜的炎症反应和代谢通 路,进而对肠屏障功能产生影响,导致相关疾病的发生^[23]。 本研究发现与高脂饮食对照组相比,Akk干预的大鼠结肠 组织中杯状细胞的数量均有所增加。Amuc_1100蛋白干 预也导致肠黏液分泌增加。因此,Akk或Amuc_1100蛋白 对改善肠道屏障功能具有一定作用。

大量证据表明肠道微生物群与肥胖、胰岛素抵抗和 T2DM等的发病机制相关^[24]。肠道微生物群可能通过其 产生的代谢物和细菌易位导致肥胖和T2DM^[25]。肠道微 生物物种多样性水平是反映机体健康的标志之一,与健 康对照组相比,肥胖和T2DM个体都伴随着物种多样性 水平的降低^[26]。本研究发现,高脂饮食导致肠道微生物 物种多样性降低,Akk活菌干预能够缓解这种变化,而 Amuc_1100蛋白干预会导致物种多样性降低和单独 OTUs数减少,这表明这两种干预方式之间存在差异。在 之后的研究中,可进一步探讨这两种干预方式对肠道微 生物群的影响。

同时,本研究也观察到了肠道微生物组组成的一些特定变化。之前的研究表明,肥胖与相对较高的厚壁菌门和较低的拟杆菌门丰度有关^[7,27]。本研究发现巴氏灭活菌、低剂量活菌和高剂量蛋白干预导致厚壁菌门/拟杆菌门的比例相对降低。我们还在Akk巴氏灭活菌和高剂量蛋白干预组大鼠的几个样本中鉴定出丰度更高的梭杆菌。有研究显示梭杆菌可诱导人肠上皮细胞系HT-29细胞中转化生长因子1的表达^[28]。

综上,本研究通过高脂饮食联合STZ注射模拟大鼠 T2DM的发生,证实Akk活菌和巴氏灭活菌干预可以有效 缓解高脂饮食引起的代谢紊乱,在一定程度上能够预防 T2DM的发生。Akk及其外膜蛋白Amuc_1100对改善肠 道屏障功能有一定作用。口服Akk或Amuc_1100蛋白8周 对大鼠肠道微生物组没有明显影响。这些结果表明Akk 有望成为一种新型的可预防肥胖、T2DM的生物制剂。

* *

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] COLLADO M C, DERRIEN M, ISOLAURI E, et al. Intestinal integrity and Akkermansia muciniphila, a mucin-degrading member of the intestinal microbiota present in infants, adults, and the elderly. Appl Environ Microb, 2007, 73(23): 7767–7770.
- [2] DERRIEN M, VAUGHAN EE, PLUGGE CM, et al. Akkermansia muciniphila gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. Int J Syst Evol Microbiol, 2004, 54(Pt 5): 1469–1476.
- [3] PLOVIER H, EVERARD A, DRUART C, *et al.* A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium

improves metabolism in obese and diabetic mice. Nat Med, 2017, 23(1): 107-113.

- [4] SCHNEEBERGER M, EVERARD A, GOMEZ-VALADES A G, et al. Akkermansia muciniphila inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice. Sci Rep, 2015, 5: 16643[2021-12-14]. https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26563823. doi: 10.1038/srep16643.
- [5] LI J, LIN S, VANHOUTTE P M, et al. Akkermansia muciniphila protects against atherosclerosis by preventing metabolic endotoxemiainduced inflammation in Apoe^{-/-} mice. Circulation, 2016, 133(24): 2434–2446.
- [6] OTTMAN N, HUUSKONEN L, REUNANEN J, et al. Characterization of outer membrane proteome of Akkermansia muciniphila reveals sets of novel proteins exposed to the human intestine. Front Microbiol, 2016, 7: 1157[2021-12-14]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27507967. doi: 10.3389/fmicb.2016.01157.
- [7] TURNBAUGH P J, LEY R E, MAHOWALD M A, et al. An obesityassociated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature, 2006, 444(7122): 1027–1031.
- [8] EVERARD A, BELZER C, GEURTS L, et al. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(22): 9066–9071.
- ZHANG X, SHEN D, FANG Z, *et al.* Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance. PLoS One, 2013, 8(8): e71108[2021-12-14]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24013136. doi: 10.1371/journal.pone.0071108.
- [10] CHAO P C, LI Y, CHANG C H, et al. Investigation of insulin resistance in the popularly used four rat models of type-2 diabetes. Biomed Pharmacother, 2018, 101: 155–161.
- [11] 董新燕,刘曼妮,刘雪,等.嗜粘蛋白阿克曼菌Amuc_1100蛋白对高脂 饲料联合链脲佐菌素干预大鼠的预防保护作用.卫生研究,2020,49: 785-789.
- [12] SHEN J, TONG X, SUD N, et al. Low-density lipoprotein receptor signaling mediates the triglyceride-lowering action of Akkermansia muciniphila in genetic-induced hyperlipidemia. Arterioscl Throm Vas, 2016, 36(7): 1448–1456.
- [13] DEPOMMIER C, EVERARD A, DRUART C, et al. Supplementation with Akkermansia muciniphila in overweight and obese human volunteers: A proof-of-concept exploratory study. Nat Med, 2019, 25(7): 1096–1103.
- [14] ISLAM M S, LOOTS DU T. Experimental rodent models of type 2 diabetes: A review. Method Find Exp Clin, 2009, 31(4): 249–261.
- [15] ZHANG G, FANG H, LI Y, *et al.* Neuroprotective effect of astragalus polysacharin on streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. Med Sci Monit, 2019, 25: 135–141.

- [16] GOYAL S N, REDDY N M, PATIL K R, et al. Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes—A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics. Chem Biol Interact, 2016, 244: 49–63.
- [17] TITCHENELL P M, LAZAR M A, BIRNBAUM M J. Unraveling the regulation of hepatic metabolism by insulin. Trends Endocrin Met, 2017, 28(7): 497-505.
- [18] REHMAN K, AKASH M S. Mechanisms of inflammatory responses and development of insulin resistance: how are they interlinked? J Biomed Sci, 2016, 23(1): 87[2021-12-14]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ pubmed/27912756. doi: 10.1186/s12929-016-0303-y.
- [19] AKASH M S H, REHMAN K, LIAQAT A. Tumor necrosis factor-alpha: Role in development of insulin resistance and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. J Cell Biochem, 2018, 119(1): 105–110.
- [20] ZHAO S, LIU W, WANG J, et al. Akkermansia muciniphila improves metabolic profiles by reducing inflammation in chow diet-fed mice. J Mol Endocrinol, 2017, 58(1): 1–14.
- [21] BISCHOFF S C, BARBARA G, BUURMAN W, et al. Intestinal permeability—a new target for disease prevention and therapy. BMC Gastroenterol, 2014, 14: 189[2021-12-14]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ 25407511. doi: 10.1186/s12876-014-0189-7.
- [22] JOHANSSON M E, HANSSON G C. Mucus and the goblet cell. Digest Dis, 2013, 31(3/4): 305–309.
- [23] TADESSE S, CORNER G, DHIMA E, et al. MUC2 mucin deficiency alters inflammatory and metabolic pathways in the mouse intestinal mucosa. Oncotarget, 2017, 8(42): 71456–71470.
- [24] CANFORA E E, MEEX R C R, VENEMA K, et al. Gut microbial metabolites in obesity, NAFLD and T2DM. Nat Rev Endocrinol, 2019, 15(5): 261–273.
- [25] BOUTER K E, VAN RAALTE D H, GROEN A K, et al. Role of the gut microbiome in the pathogenesis of obesity and obesity-related metabolic dysfunction. Gastroenterology, 2017, 152(7): 1671–1678.
- [26] QIN J, LI Y, CAI Z, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. Nature, 2012, 490(7418): 55–60.
- [27] TURNBAUGH P J, HAMADY M, YATSUNENKO T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. Nature, 20069, 457(7228): 480–484.
- [28] MARTIN-GALLAUSIAUX C, BEGUET-CRESPEL F, MARINELLI L, et al. Butyrate produced by gut commensal bacteria activates TGF-beta1 expression through the transcription factor SP1 in human intestinal epithelial cells. Sci Rep, 2018, 8(1): 9742[2021-12-14]. https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29950699. doi: 10.1038/s41598-018-28048-y.

(2021-08-21收稿, 2021-12-15修回) 编辑 姜 恬