

· 临床论著 ·

柴胡加龙骨牡蛎汤对 2 型糖尿病合并
抑郁患者肠道菌群的影响

李 宇 蔡萧君 王 雪 李浩经 张卓辉 吴圆圆 王 钦

摘要 **目的** 观察柴胡加龙骨牡蛎汤联合黛力新对 2 型糖尿病合并抑郁患者肠道菌群的影响。**方法** 选取 2 型糖尿病合并抑郁患者共计 86 例, 随机分为试验组和对照组, 每组 43 例。对照组予口服氟哌噻吨美利曲辛片(黛力新)治疗, 每日 2 次, 早晨及中午各 1 片; 试验组予黛力新联合柴胡加龙骨牡蛎汤, 中药每日 2 次, 每次 1 袋。干预疗程均为 8 周。比较两组治疗前后空腹血糖(FPG)、餐后血糖(2hPG)、糖化白蛋白(GA)、白细胞介素-6(IL-6)、C 反应蛋白(CRP)、5-羟色胺(5-HT)、汉密尔顿抑郁量表(HAMD-17)评分、抑郁自评量表(SDS)评分、中医证候评分的变化, 通过 16s rDNA 高通量测序对肠道菌群 OUT 数量、多样性指数及差异菌群进行综合分析和评价。**结果** 最终纳入统计 80 例患者, 试验组和对照组各 40 例。与本组治疗前比较, 治疗后两组患者的 FPG、2hPG、GA、IL-6、CRP 水平均降低($P<0.05$), 5-HT 水平升高($P<0.05$), 其中试验组 GA、IL-6、CRP、5-HT 的改善程度明显优于对照组($P<0.05$)。与对照组治疗后比较, 试验组 HAMD-17 评分、中医证候积分均降低($P<0.05$)。Alpha 多样性分析显示, 治疗后试验组 Shannon 指数、Chao 指数、Ace 指数均升高($P<0.05$), Simpson 指数降低($P<0.05$)。Beta 多样性分析显示, 治疗后试验组患者肠道微生物群落的分布位置和象限区间较基线发生明显变化。LefSe 差异分析显示, 试验组治疗前后有 4 个差异菌门、7 个差异菌科、9 个差异菌属, 与对照组同期相比主要表现为厚壁菌门(*Firmicutes*)丰度上调, 变形菌门(*Proteobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)丰度下调。**结论** 柴胡加龙骨牡蛎汤能够有效改善 2 型糖尿病合并抑郁患者的临床症状, 其机制可能与下调炎症细胞因子水平、上调 5-HT 浓度以及调节肠道菌群有关。

关键词 柴胡加龙骨牡蛎汤; 肠道菌群; 抑郁; 2 型糖尿病; 中药复方; 中西医结合

Effect of Chaihu plus Longgu Muli Decoction on Intestinal Microflora of Type 2 Diabetes Patients with Depression LI Yu, CAI Xiao-jun, WANG Xue, LI Hao-jing, ZHANG Zhuo-hui, WU Yuan-yuan, and WANG Qin Department of Endocrinology, Traditional Chinese Medicine Academy of Heilongjiang, Harbin (150000)

ABSTRACT Objective To observe the effects of Chaihu plus Longgu Muli Decoction (CLMD) on intestinal microflora structural characteristics of patients with type 2 diabetes mellitus complicated with depression. **Methods** A total of 86 patients with type 2 diabetes mellitus complicated with depression were randomly divided into the experimental group and control group, with 43 patients in each group. The control group was orally treated with flupentixol melitracen tablets (Deanxit), twice a day, one tablet in the morning and one tablet at noon, the experimental group received Deanxit combined with CLMD twice a day, one bag each time. The intervention course remained 8 weeks. The changes of fasting blood glucose (FPG), postprandial blood glucose (2hPG), glycosylated albumin (GA), interleukin-6 (IL-6), C-reactive protein (CRP), Hamilton Depression Scale (HAMD-17) score, Self-Rating Depression Scale (SDS) score and Chinese medicine (CM) syndrome score were compared between the two groups before and after treatment. The OUT number, diversity index and

基金项目: 黑龙江省应用技术与开发计划项目 (No. GA19C108)

作者单位: 黑龙江省中医药科学院内分泌科 (哈尔滨 150000)

通讯作者: 蔡萧君, Tel: 0451-55653086, E-mail: ssycxj@163.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20230517.079

differential flora of intestinal flora were comprehensively analyzed and evaluated by 16S rDNA high-throughput sequencing. **Results** Compared with before treatment, the levels of FPG, 2hPG, GA, IL-6 and CRP in two groups significantly decreased after treatment ($P<0.05$), 5-HT level increased ($P<0.05$), the improvement degree of GA, IL-6, CRP and 5-HT in the experimental group was better than those in control group ($P<0.05$). Compared with the control group after treatment, HAMD-17 score and CM syndrome score of experimental group significantly decreased ($P<0.05$). Alpha diversity analysis showed that Shannon index, Chao index and Ace index increased significantly after treatment ($P<0.05$), Simpson index significantly decreased ($P<0.05$). Beta diversity analysis showed that after treatment, the distribution location and quadrant range of intestinal microflora in the experimental group changed significantly compared with the baseline. LefSe difference analysis showed that there were 4 differentially divided phyla, 7 differentially divided families and 9 differentially divided genera in the experimental group before and after treatment. Compared with the control group at the same time, the abundance of *Firmicutes* was mainly increased. The abundance of *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* decreased. **Conclusion** CLMD can effectively improve the clinical symptoms of type 2 diabetes patients with depression, and the mechanism may be related to down-regulation of inflammatory cytokines, up-regulation of 5-HT concentration and regulation of intestinal microflora structure.

KEYWORDS Chaihu plus Longgu Muli Decoction; intestinal microflora; depression; type 2 diabetes; Chinese herbal compound; integrative medicine

糖尿病患者中的抑郁患病率高达 15%，是非糖尿病人群的 2 倍^[1, 2]。抑郁被证实是糖尿病发生发展的独立危险因素，可增加糖尿病患者认知功能障碍、微血管和大血管并发症的发生率和早期全因死亡率^[3, 4]，同时糖尿病作为抑郁症状的预测因子，可能导致更严重的抑郁症^[5]。两者间复杂的双向相互作用，主要涉及慢性炎症、胰岛素抵抗、氧化和亚硝化应激、线粒体功能障碍及海马结构的改变^[6-8]。近年研究表明，微生物—肠—脑轴（microbial-gut-brain axis, MGB）也与糖尿病合并抑郁（diabetes mellitus with depression, DD）的高共病率密切相关，炎症细胞因子、神经递质和细菌代谢产物是肠道微生物与大脑间双向联系的关键介质^[9, 10]。有研究发现，2 型糖尿病患者的血清白介素 6（interleukin-6, IL-6）和 C 反应蛋白（C-reactive protein, CRP）水平与抑郁症状的严重程度呈显著正相关^[11, 12]。通过上调产生短链脂肪酸（short chain fatty acids, SCFAs）的瘤胃球菌和双歧杆菌数量，可显著降低 2 型糖尿病患者的抑郁评分和糖化血红蛋白（glycated hemoglobin, HbA1c）水平^[13]。从 MGB 轴角度调节认知功能，以肠道菌群为干预靶点将为 2 型糖尿病合并抑郁的防治提供新思路。

柴胡加龙骨牡蛎汤为中医学安神剂名方，源自张仲景的《伤寒论》，主治太阳表证误下邪陷，致少阳气郁，热扰心神证，其功擅和解少阳，镇惊安神，现临床被广泛用于失眠、抑郁、焦虑等情志病的治疗^[14]。本课题组前期研究发现，柴胡加龙骨牡蛎汤具有剂量

依赖性的抗抑郁作用，可通过上调 2 型糖尿病合并抑郁大鼠海马中脑源性神经营养因子（brain-derived neurotrophic factor, BDNF）/ 酪氨酸激酶 B（tyrosine kinase B, TrkB）/ 环磷腺苷效应元件结合蛋白（camp response element-binding protein, CREB）信号通路，增强海马组织神经元的再生和修复，显著改善大鼠的抑郁行为^[15, 16]。但该复方对 2 型糖尿病合并抑郁患者的肠道微生态是否具有调节作用尚未见报道。因此，本研究拟采用 16S rDNA 高通量测序技术，观察柴胡加龙骨牡蛎汤干预前后患者肠道菌群结构特征的变化，明确柴胡加龙骨牡蛎汤的抗抑郁机制与肠道微生态变化之间的潜在相关性，以期为临床上 2 型糖尿病合并抑郁的评价与诊疗提供理论依据。

资料与方法

1 诊断标准 西医诊断标准：参照中华医学会糖尿病学分会发布的《中国 2 型糖尿病防治指南 2020 年版》^[17]，中华医学会精神病学分会制定的《中国精神障碍分类与诊断标准第三版（CCMD-III）》^[18]，结合汉密尔顿抑郁量表（Hamilton Depression Scale, HAMD-17）评分标准^[19]。中医诊断标准：参照中华人民共和国卫生部发布的《中药新药临床研究指导原则》^[20]，结合国家中医药管理局颁布的《中医病证诊断疗效标准 2019 年版》^[21]中消渴病和郁证的诊断标准。

2 纳入标准 （1）符合诊断标准；（2）年龄 18~65 周岁；（3）入组时基线 HAMD-17 量表评分

7~24 分; (4) 自愿参加并签署知情同意书。

3 排除标准 (1) 入组前 8 周内曾接受过心理治疗或抗抑郁相关中西药物治疗者; (2) 入组前 8 周内曾服用过抗生素和 (或) 微生态调节剂者; (3) 溃疡性结肠炎、克罗恩病等炎症性肠病患者; (4) 既往有严重自杀倾向或 HAMD-17 量表中自杀一项评分 ≥ 1 分者; (5) 入组前 8 周内服用过糖皮质激素、免疫抑制剂、避孕药、抗结核药等可引起血糖升高的药物; (6) 伴心功能不全和 (或) 肝肾功能异常者; (7) 对中药过敏或过敏体质者; (8) 妊娠、备孕或哺乳期妇女。

4 剔除标准 (1) 依从性不佳, 未遵医嘱, 自行改药或停药, 影响疗效判断者; (2) 治疗期间未经研究者许可自行联合用药者; (3) 临床资料收集不全者。

5 脱落标准 (1) 治疗期间主动要求退出者; (2) 超过复诊规定时间 1 周, 且电话随访 3 次以上未取得直接联系者; (3) 发生严重不良反应不能耐受者。

6 一般资料 病例均来源于 2020 年 12 月—2021 年 12 月就诊于黑龙江省中医医院内分泌科住院部的 2 型糖尿病合并抑郁患者, 对 127 例患者进行筛选后, 最终纳入 86 例。采用随机数字表法分为试验组和对照组, 每组各 43 例。随机数字的分组由独立于研究者和受试者的第三方执行, 第三方不参与纳入受试者。随机分配表一式三份, 由课题负责人、研究主办者和数据分析员各保管一份, 不透明信封法进行随机隐藏, 盲法对象为受试者和研究人员, 破盲时三份随机分配表同时揭封, 由独立于研究者和受试者的第三方将不同药物装入相应药袋。两组患者年龄、性别、病程、BMI 和胰岛素用量比较 (表 1), 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。本研究已通过黑龙江省中医药科学院医学伦理委员会伦理审批 [No. 伦审科研临第 (2020-030-01) 号]。

7 治疗方法 对两组患者进行糖尿病教育, 给予相同生活方式干预和血糖监测, 参考《中国糖尿病膳食指南 (2017)》^[22], 嘱患者低盐低脂糖尿病饮食, 均在医院食堂进餐, 每周至少进行 150 min 中等强度运动, 运动后心率在 $(220 - \text{年龄}) \times (50 \sim 70\%)$ 范围内, 规律作息, 降糖药物选择胰岛素和促泌剂, 使血糖维持在空腹血糖 (fasting plasma glucose,

FPG) ≤ 7 mmol/L, 餐后血糖 (2 hours postprandial plasma glucose, 2hPG) ≤ 10 mmol/L。对照组予氟哌噻吨美利曲辛片 (黛力新, 丹麦 H.Lundbeck A/S 公司, 批号: H20171104, 每片含氟哌噻吨 0.5 mg、美利曲辛 10 mg), 每日 2 次, 早晨及中午各 1 片。试验组予黛力新联合柴胡加龙骨牡蛎汤。柴胡加龙骨牡蛎汤组成: 柴胡 (批号: 18100014) 25 g、党参 (批号: 19071816) 20 g、清半夏 (批号: 19052453) 10 g、黄芩 (批号: 19040124) 10 g、桂枝 (批号: 18100164) 15 g、茯苓 (批号: 19071191) 15 g、煅龙骨 (批号: 19056723) 25 g、煅牡蛎 (批号: 19056653) 25 g、大黄 (批号: 18110294) 6 g、生姜 (批号: 18100154) 10 g、大枣 (批号: 19046814) 10 g, 中药饮片均购于江阴天江药业有限公司, 由黑龙江省中医医院中药房统一代煎, 每日 2 次, 早晚饭后温服, 每袋 200 mL。两组干预疗程均为 8 周。

8 观察指标及方法

8.1 实验室指标 在治疗前和治疗后 8 周时, 留取患者清晨空腹静脉血, 血液标本在 30 min 内离心 (3 000 r/min, 10 min) 获取血清样本, 储存至 -80°C 冰箱。待所有样本采集冻存完成后, 统一送检黑龙江省中医医院检验科。检测指标包括 FPG、2hPG、糖化白蛋白 (glycated albumi, GA)、谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、IL-6、CRP、5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)。

8.2 中医证候评分 根据治疗前后消渴郁证中医证候积分表的评分变化判断疗效, 采用尼莫地平方法^[23], 计算疗效指数。疗效指数 (n) = (治疗前积分 - 治疗后积分) / 治疗前积分 $\times 100\%$ 。临床治愈: 症状、体征消失或基本消失, $n \geq 95\%$; 显效: 症状、体征明显改善, $70\% \leq n < 95\%$; 有效: 症状、体征均有好转, $30\% \leq n < 70\%$; 无效: 症状、体征无明显改善或加重, $n < 30\%$ 。

8.3 汉密尔顿抑郁量表 (hamilton depression scale, HAMD-17) 评分 采用交谈与观察的方式, 由两名评定者分别独立评分, 评价抑郁严重程度及治疗效果^[19]。

8.4 抑郁自评量表 (self-rating depression scale, SDS) 评分 采用 4 级评分标准, 将各项得分相加, 得到标准分, 标准分越高, 表明抑郁症状越严重^[24]。

表 1 两组患者一般资料比较

组别	例数	年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	性别 (例, 男/女)	病程 (月, $\bar{x} \pm s$)	BMI (kg/m^2 , $\bar{x} \pm s$)	胰岛素用量 (IU, $\bar{x} \pm s$)
试验	43	54.46 $\pm$ 8.92	22/21	56.27 $\pm$ 13.36	24.69 $\pm$ 2.13	16.73 $\pm$ 5.64
对照	43	55.61 $\pm$ 9.27	20/23	54.64 $\pm$ 17.62	25.53 $\pm$ 2.25	15.51 $\pm$ 5.79

8.5 粪便样本采集 常温取样法采集患者治疗前后的粪便标本，嘱患者先排尽尿液后进行两次冲水，自然排便后，使用无菌粪便采集管立即收集中段内部未被污染的粪便样本，取样量为管内 1/3~1/2 即可。于无菌环境下分装，每份留取 3~5 g 放入 5 mL 冻存管，30 min 内将样本转移至 -80 ℃ 冰箱冻存直至检测。待各组样本收集完毕后，由专人在液氮条件下运送至上海生工生物工程股份有限公司进行 16s rDNA V3-V4 区高通量测序。

9 统计学方法 采用 SPSS 26.0 统计软件分析数据。计量资料符合正态分布，方差齐则采用 *t* 检验，非正态分布时改用秩和检验。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。重复测量资料组间和组内比较采用重复测量方差分析和简单效应分析。所有检验统计都为双侧检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 病例流程图 (图 1) 试验组脱落 3 例，其中 2 例因粪便采集量不足脱落，1 例自动退出；对照组脱落 3 例，其中 1 例因漏服黛力新退出，1 例因自觉疗效不佳退出，1 例失访。最终有 80 例患者纳入统计分析，试验组和对照组各 40 例。

2 两组实验室指标结果比较 (表 2) 与本组治疗前比较，两组患者治疗后 FPG、2hPG、GA、IL-6、CRP 水平降低 ($P < 0.05$)，5-HT 水平升高 ($P < 0.05$)。与对照组治疗后比较，试验组的 GA、IL-6、CRP 水平降低 ($P < 0.05$)，5-HT 水平升高 ($P < 0.05$)。ALT、AST 的组内、组间比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

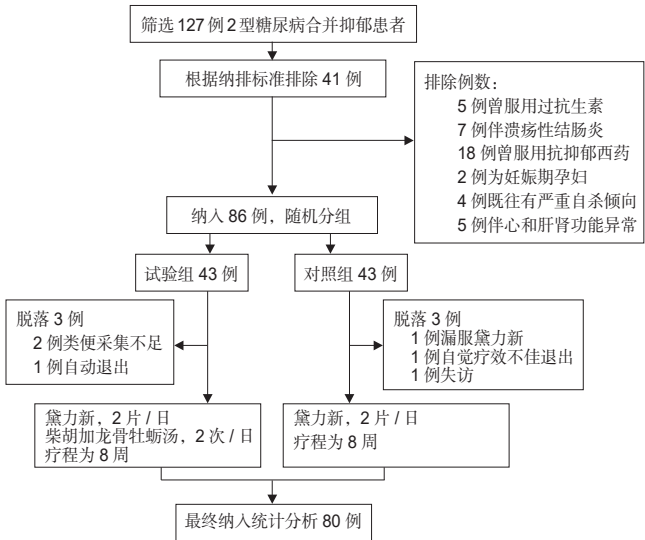


图 1 病例流程图

3 两组 HAMD-17 量表、SDS 量表、中医证候积分比较 (表 3) 与本组治疗前比较，两组患者治疗后 HAMD-17 评分、SDS 评分、中医证候积分均降低 ($P < 0.05$)。与对照组治疗后比较，试验组 HAMD-17 评分、中医证候积分均降低 ($P < 0.05$)，而 SDS 评分差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

4 两组中医证候疗效比较 (表 4) 治疗 8 周后，试验组患者总有效率为 90.0% (18/40)，对照组患者总有效率 65.0% (13/40)，经 Fisher 精确概率检验，试验组的总有效率显著高于对照组 ($P = 0.001$)。

表 4 两组患者临床疗效比较

组别	例数	治愈 (例)	显效 (例)	有效 (例)	无效 (例)	总有效率 (%)
试验	40	0	20	16	4	90.0*
对照	40	0	6	20	14	65.0

注：与对照组比较，* $P < 0.05$

表 2 两组治疗前后 FPG、2hPG、GA、ALT、AST、5-HT、IL-6、CRP 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	FPG (mmol/L)	2hPG (mmol/L)	GA (%)	ALT (U/L)	AST (U/L)	5-HT (ng/mL)	IL-6 (ng/L)	CRP (mg/L)
试验	40	治疗前	8.83 ± 1.07	10.53 ± 1.97	25.26 ± 7.72	18.71 ± 1.02	18.72 ± 2.16	115.27 ± 14.66	36.17 ± 5.73	5.22 ± 8.58
		治疗后	5.17 ± 1.15*	8.15 ± 2.82*	20.31 ± 3.73* [△]	18.17 ± 2.36	17.75 ± 2.19	182.45 ± 23.62* [△]	24.56 ± 4.27* [△]	3.40 ± 3.19* [△]
对照	40	治疗前	8.68 ± 1.59	10.18 ± 1.04	25.81 ± 7.19	18.06 ± 1.74	18.33 ± 2.63	113.48 ± 14.21	35.01 ± 4.05	5.53 ± 7.45
		治疗后	5.35 ± 1.82*	8.27 ± 2.15*	22.69 ± 3.01*	19.06 ± 3.11	18.11 ± 2.84	143.93 ± 24.36*	28.14 ± 5.78*	4.18 ± 4.84*

注：与本组治疗前比较，* $P < 0.05$ ；与对照组同期比较，[△] $P < 0.05$

表 3 治疗前后量表评分比较 (分， $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	HAMD-17 评分	SDS 评分	中医证候积分
试验	40	治疗前	18.46 ± 4.13	64.98 ± 4.91	24.67 ± 7.18
		治疗后	8.35 ± 3.26* [△]	59.34 ± 5.21*	12.57 ± 6.02* [△]
对照	40	治疗前	18.51 ± 4.72	65.74 ± 4.50	24.41 ± 6.42
		治疗后	10.12 ± 3.15*	61.93 ± 5.86*	15.31 ± 7.61*

注：与本组治疗前比较，* $P < 0.05$ ；与对照组同期比较，[△] $P < 0.05$

5 肠道菌群结构特征比较

5.1 测序序列统计与 OUT 分析(图 2) 对 80 个样本进行 IlluminaMiSeq 测序和质控过滤后, 共获得 2 947 283 条有效序列, 平均每个样本的序列数目为 $(55\,261.58 \pm 4\,185.08)$ 条, 序列长度主要集中在 411~450 bp 之间, 平均长度为 (422.86 ± 7.77) bp。利用 Usearch 软件, 去冗余序列合并后进行 OUT 聚类, 利用 RDP classifier 将所有 cleanreads 与 RDP 数据库进行比对, 选出相似性在 97% 以上的 mappedreads 用于样品微生物丰度和多样性的后续评估分析, 共得到 2 739 806 条高质量的基因序列, 平均每个样本的序列数量为 $(51\,371.37 \pm 4\,266.49)$

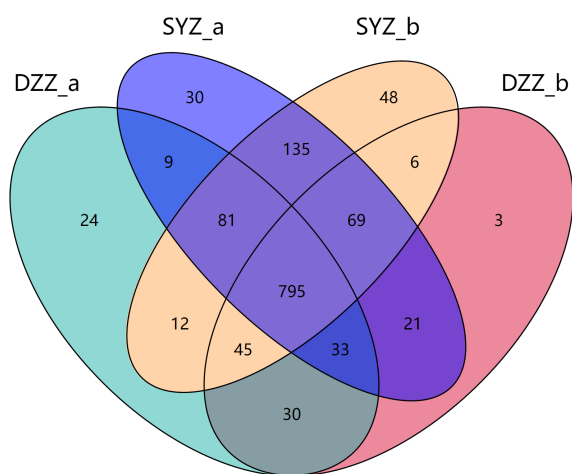


图 2 两组患者 OUT 聚类韦恩图

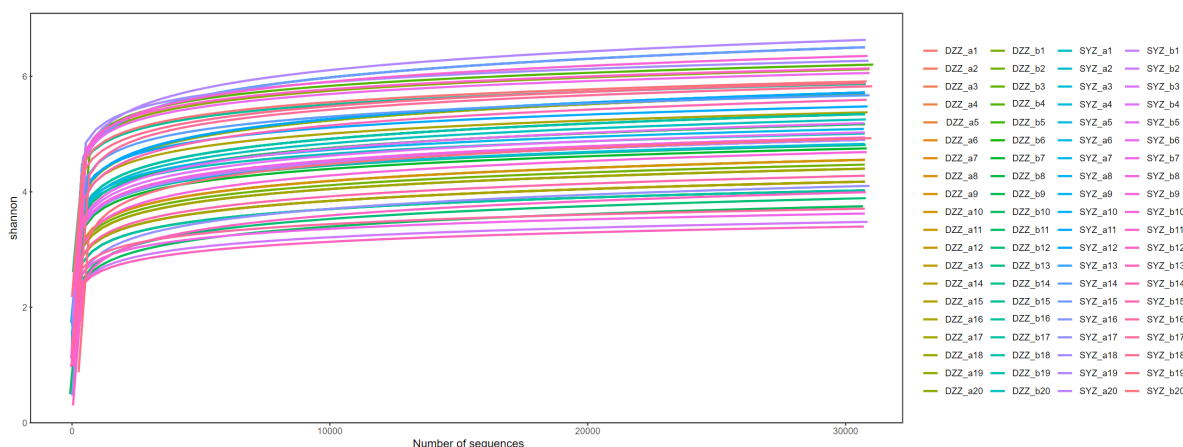


图 3 样本菌群 Rarefaction 曲线图

表 5 Alpha 多样性指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	Shannon	Simpson	Chao	Ace	Coverage
试验	40	治疗前	3.48 ± 0.37	0.16 ± 0.06	353.66 ± 57.37	314.23 ± 61.36	1.00 ± 0.00
		治疗后	$3.75 \pm 0.41^{* \Delta}$	$0.13 \pm 0.08^{*}$	$384.61 \pm 63.79^{* \Delta}$	$342.66 \pm 73.54^{* \Delta}$	1.00 ± 0.00
对照	40	治疗前	3.56 ± 0.28	0.15 ± 0.03	346.29 ± 56.63	326.81 ± 63.48	1.00 ± 0.00
		治疗后	3.44 ± 0.52	0.14 ± 0.05	323.44 ± 73.81	293.12 ± 72.39	1.00 ± 0.00

注: 与本组治疗前比较, $^{*}P < 0.05$; 与对照组同期比较, $^{\Delta}P < 0.05$

条, 各样本划分的 OUT 总数为 1 341 个。四组共有 OUT 为 795 个, 试验组治疗前 (SYZ_a) 共有 OUT 1 174 个, 独有 30 个, 试验组治疗后 (SYZ_b) 共有 OUT 1 191 个, 独有 48 个; 对照组治疗前 (DZZ_a) 共有 OUT 1 029 个, 独有 24 个, 对照组治疗后 (DZZ_b) 共有 OUT 1 002 个, 独有 3 个。

5.2 Alpha 多样性分析(图 3, 表 5) 通过绘制稀释曲线 (rarefaction curve), 对测序深度进行评估。在测序数据量达到 30 000 时, 曲线均趋于平缓, 表明本次测序数据量合理, 可以反映文库样本的菌群结构特征。对 OUT 统计数据抽平后, 计算所有样本的多样性指数。结果显示, 与本组治疗前比较, 治疗后, 对照组 Shannon 指数、Simpson 指数、Chao 指数、Ace 指数均有降低, 但差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 试验组 Shannon 指数、Chao 指数、Ace 指数显著升高 ($P < 0.05$), Simpson 指数显著降低 ($P < 0.05$); 且治疗后试验组 Shannon 指数、Chao 指数、Ace 指数高于对照组 ($P < 0.05$)。Coverage 指数组间、组内比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

5.3 Beta 多样性分析(图 4) Bray-Curtis PCoA 结果显示, Axis1、Axis 2、Axis3 表示第一、第二、第三主成分对样品差异的贡献值分别为 18.44%、16.05%、12.42%。治疗前试验组和对照组在 PCoA 得分图中分布接近, 表明入组时两组患者的肠道菌群组成基线较为相似。经 8 周药物治疗后, 试验组患者

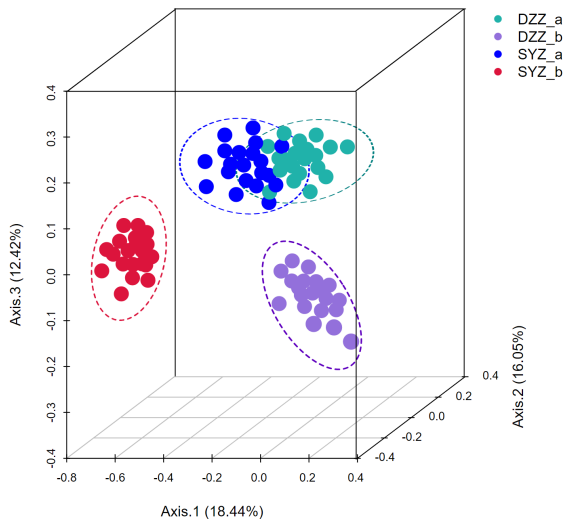
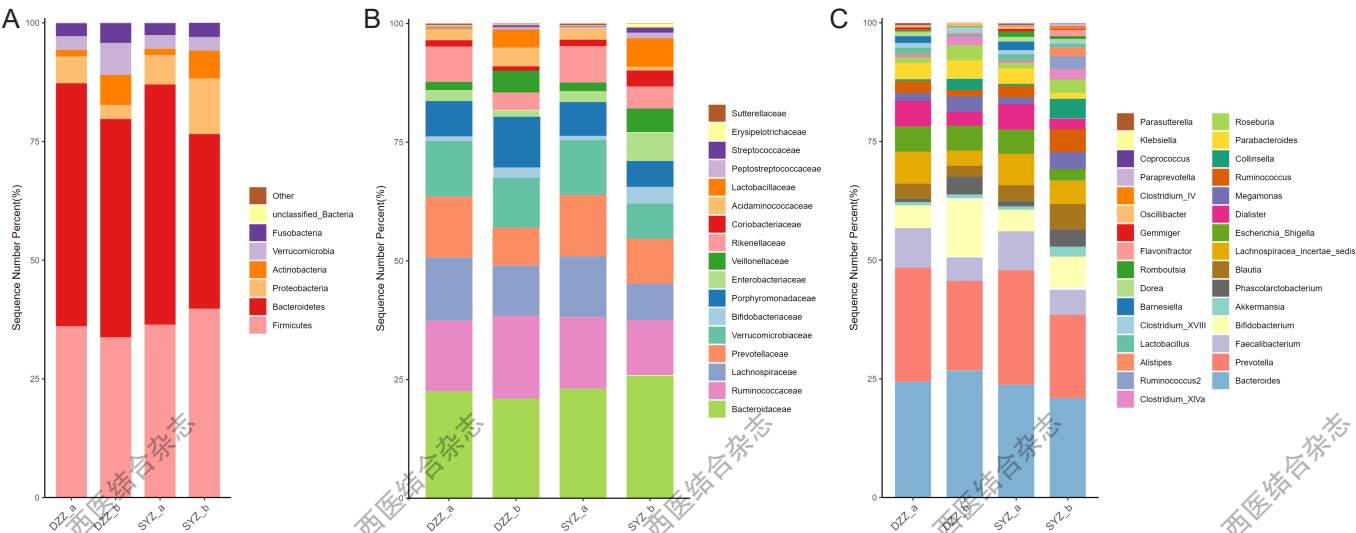


图 4 样本菌群 Bray-Curtis PCoA 分析

样本在得分图中的分布位置和象限区间明显不同,表明肠道菌群结构特征发生显著变化,而对照组患者治疗后样本的分布位置与治疗前相近,落在同一象限区间。

5.4 分类学组成分析(图 5、6) 使用 RDP classifier 贝叶斯算法对聚类的 795 个 OUT 与 Silva 数据库进行比对,统计各组样本在不同分类学水平上的群落结构特征。结合 LefSe 分析和线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA),寻找组间在相对丰度上具有统计学差异的生物标识(Biomarker)。对照组治疗前后有 4 个差异菌门、5 个差异菌科、4 个差异菌属,试验组治疗前后有 4 个差异菌门、7 个差异菌科、9 个差异菌属。与本组治疗前比较,对照组在门水平放线菌门(*Actinobacteria*)丰度上调,梭杆菌门(*Fusobacteria*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)丰

度下调,在科水平红螯菌科(*Coriobacteriaceae*)、拟杆菌科(*Bacteroidaceae*)丰度上调,理研菌科(*Rikenellaceae*)、双歧杆菌科(*Bifidobacteriaceae*)、普雷沃氏菌科(*Prevotellaceae*)丰度下调,在属水平拟杆菌属(*Bacteroides*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)丰度上调,普拉梭菌属(*Faecalibacterium*)、普氏菌属(*Prevotella*)丰度下调;而柴胡加龙骨牡蛎汤干预后试验组在门水平厚壁菌门(*Firmicutes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、变形菌门(*Proteobacteria*)丰度上调,*Bacteroidetes*丰度下调,在科水平韦荣氏菌科(*Veillonellaceae*)、*Coriobacteriaceae*、*Bacteroidaceae*、*Rikenellaceae*、*unclassified_Clostridiales*丰度上调,瘤胃菌科(*Ruminococcaceae*)、*Prevotellaceae*丰度下调,在属水平巨单胞菌属(*Megamonas*)、柯林斯菌属(*Collinsella*)、另枝杆菌属(*Alistipes*)、大肠志贺氏杆菌属(*Escherichia Shigella*)、巴恩斯氏菌属(*Barnesiella*)丰度上调,*Prevotella*、小类杆菌属(*Dialister*)、毛螺菌属(*Lachnospiraceae incertae sedis*)、*Bacteroides*丰度下调。与对照组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤干预后试验组在门水平 *Firmicutes* 丰度上调,*Proteobacteria*、*Bacteroidetes*丰度下调,在科水平 *Veillonellaceae*、*Rikenellaceae*、*unclassified_Clostridiales*丰度上调,消化链球菌科(*Peptostreptococcaceae*)、*Coriobacteriaceae*、*Bacteroidaceae*丰度下调,在属水平 *Megamonas*、*Prevotella*、*Alistipes*、*Collinsella*、阿里松菌属(*Allisonella*)丰度上调,副杆菌属(*Parabacteroides*)、*Bacteroides*丰度下调。



注: A 为门分类水平; B 为科分类水平; C 为属分类水平

图 5 样本菌群结构组成分析

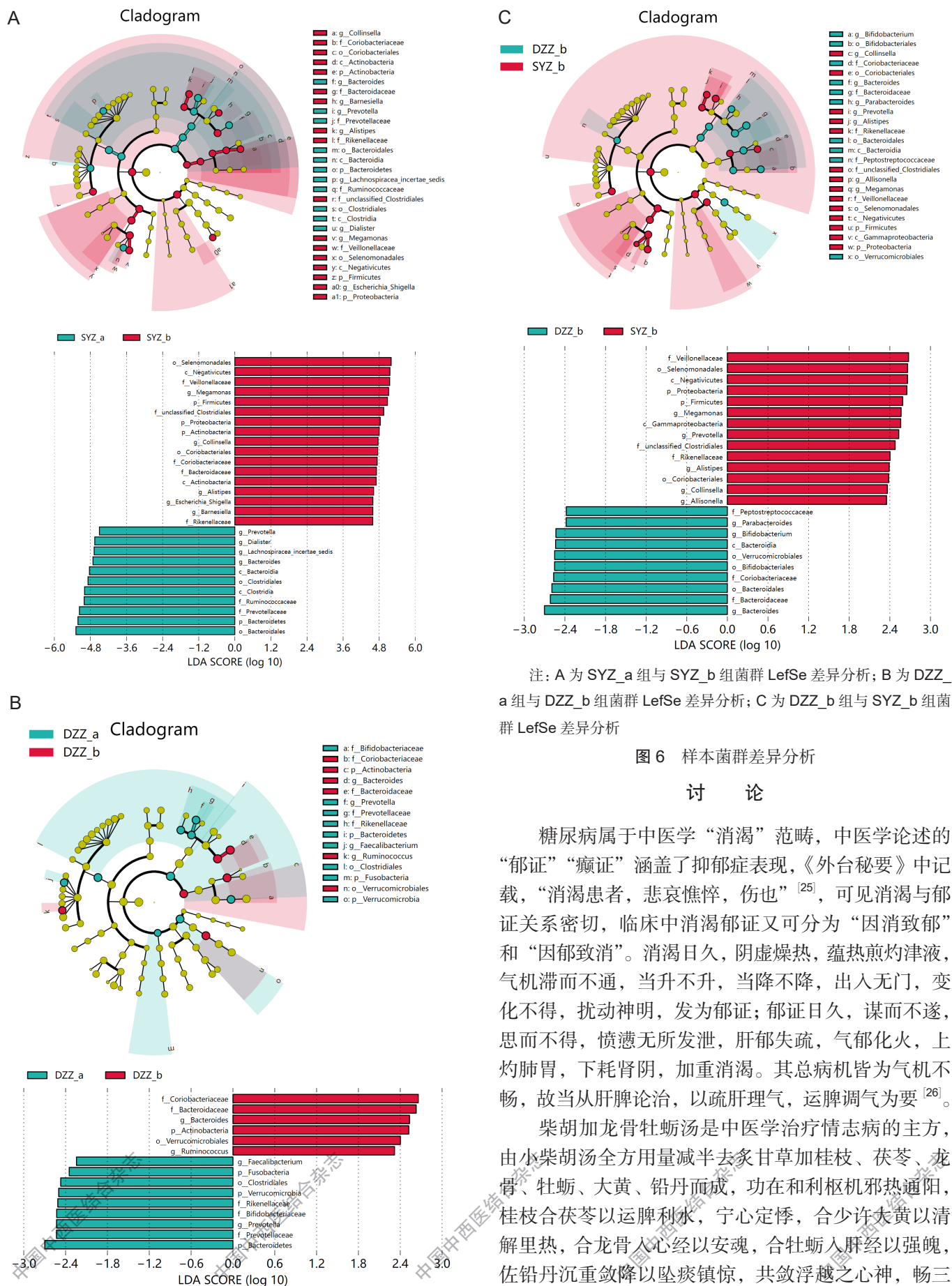


图 6 样本菌群差异分析

讨论

糖尿病属于中医学“消渴”范畴，中医学论述的“郁证”“癰证”涵盖了抑郁症表现，《外台秘要》中记载，“消渴患者，悲哀憔悴，伤也”^[25]，可见消渴与郁证关系密切，临床中消渴郁证又可分为“因消致郁”和“因郁致消”。消渴日久，阴虚燥热，蕴热煎灼津液，气机滞而不通，当升不升，当降不降，出入无门，变化不得，扰动神明，发为郁证；郁证日久，谋而不遂，思而不得，愤懑无所发泄，肝郁失疏，气郁化火，上灼肺胃，下耗肾阴，加重消渴。其总病机皆为气机不畅，故当从肝脾论治，以疏肝理气，运脾调气为要^[26]。

柴胡加龙骨牡蛎汤是中医学治疗情志病的主方，由小柴胡汤全方用量减半去炙甘草加桂枝、茯苓、龙骨、牡蛎、大黄、铅丹而成，功在和利枢机邪热通阳，桂枝合茯苓以运脾利水，宁心定悸，合少许炙甘草以清解里热，合龙骨入心经以安魂，合牡蛎入肝经以强魄，佐铅丹沉重敛降以坠痰镇惊，共敛浮越之心神，畅三

焦之气机。现代药理研究发现,天然黄酮类糖苷黄芩苷可降低抑郁模型小鼠血清和海马中 IL-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平,改善氧化应激和减少细胞凋亡,还可通过重塑肠道微生物群结构,降低血清氧化三甲胺 (trimethylamine oxide, TMAO) 水平和改善海马神经元可塑性^[27, 28],具有明确的抗抑郁和肠道微生态调节作用。

2 型糖尿病和抑郁症之间存在双向联系,肠道微生态失调和炎症损伤是 2 型糖尿病和抑郁症共病的主要生物学途径和关键环节^[29]。长期的高脂饮食可引起肠道菌群失衡,有益菌双歧杆菌和乳酸菌丰度降低,富含内毒素 (lipopolysaccharide, LPS) 的革兰氏阴性菌丰度增加,过度富集的 LPS 可通过降低肠黏膜屏障功能,激活 TLR4/MD-2 和 MAPK 信号通路,诱发炎症细胞因子 IL-6 和 CRP 浓度升高,引起胰腺 β 细胞凋亡和胰岛素抵抗,导致糖尿病的发生^[30, 31]。人体外周组织中 95% 的 5-HT 来源于色氨酸 (tryptophan, TRP),慢性炎症状态下,大肠埃希菌等菌群内 TRP 生成减少,TRP 经肠道嗜铬细胞内色氨酸羟化酶 (tryptophan hydroxylase, TPH) 羟生化生成的 5-HT 水平降低,对肠道内稳态、机体免疫、神经可塑性和情感认知功能发挥负向调节作用,进一步诱发或加重抑郁^[32]。本研究中,试验组患者治疗后的 HAMD-17 评分和中医证候积分均较治疗前降低,血清 GA、IL-6、CRP 水平显著降低,5-HT 水平显著升高,且优于对照组 ($P<0.05$)。证实柴胡加龙骨牡蛎汤联合黛力新可有效改善 2 型糖尿病合并抑郁患者的临床症状,下调炎症细胞因子 IL-6、CRP 水平、上调 5-HT 浓度,且疗效较单用黛力新更佳。

作为人体“第二基因组”,肠道微生物群的群落稳定性和物种多样性是肠道稳态和宿主健康的核心^[33]。Shannon、Chao、Ace 指数均为评估微生物群落整体丰富度的指数,其值越大,表征群落多样性越高;Simpson 指数是在菌群丰富度基础上衡量优势菌属的优势度和均匀度,其值越大,表征群落多样性越低。Kelly JR 等^[34]对抑郁症患者肠道菌群分析显示,与健康对照组相比其 Alpha 多样性的丰富度指数显著降低。拟杆菌门、变形菌门在 2 型糖尿病和抑郁症患者的肠道中高度富集,拟杆菌门和厚壁菌门的比值与血糖水平、抑郁症状呈显著正相关^[35]。本研究发现,试验组的 Shannon、Chao、Ace 指数显著升高 ($P<0.05$),而 Simpson 指数显著降低 ($P<0.05$)。Beta 多样性分析显示,治疗后患者肠道微生物群落

的分布位置和象限区间较基线发生明显变化。对群落结构分析显示,试验组患者肠道中厚壁菌门相对丰度增加,拟杆菌门、变形菌门相对丰度减少。表明柴胡加龙骨牡蛎汤可对 2 型糖尿病合并抑郁患者肠道菌群发挥整体调节作用,推测可能与中药复方的多靶向、多路径特性有关。

综上,本研究证实,柴胡加龙骨牡蛎汤联合黛力新可一定程度改善 2 型糖尿病合并抑郁患者的情绪障碍,其机制可能与下调炎症细胞因子水平、上调 5-HT 浓度及调节肠道菌群结构有关,为中药复方用于此类疾病的临床诊疗提供了循证学依据。但本研究仍然存在局限,由于中式餐饮制作较为复杂,未对饮食结构、烹饪方式、佐料种类、抗菌餐具进行严格限制,且未将地域特点、生活环境等因素纳入研究,方药有效成分与肠道微生物群的具体相互作用机制还有待通过靶标代谢组学、宏基因组测序、粪菌移植等进一步揭示。

利益冲突:本研究无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Snoek FJ, Bremmer MA, Hermanns N. Constructs of depression and distress in diabetes: time for an appraisal[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2015, 3 (6): 450-460.
- [2] Sartorius N. Depression and diabetes[J]. *Dialogues Clin Neurosci*, 2018, 20 (1): 47-52.
- [3] Schmitz N, Deschênes SS, Burns RJ, et al. Depression and risk of type 2 diabetes: the potential role of metabolic factors[J]. *Mol Psychiatry*, 2016, 21 (12): 1726-1732.
- [4] de Groot M, Shubrook JH, Hornsby WG Jr, et al. Program ACTIVE II: outcomes from a randomized, multistate community-based depression treatment for rural and urban adults with type 2 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2019, 42 (7): 1185-1193.
- [5] Stedman M, Eltom S, Solomon E, et al. Living with diabetes and its impact on mental health: results of an online survey[J]. *Cardiovasc Endocrinol Metab*, 2022, 11 (2): e0262.
- [6] Semenkovich K, Brown ME, Svrakic DM, et al. Depression in type 2 diabetes mellitus: prevalence, impact, and treatment[J]. *Drugs*, 2015, 75 (6): 577-587.
- [7] Diabetes Prevention Program Research Group. Lipid, lipoproteins, C-reactive protein, and hemostatic factors at baseline in the diabetes

- prevention program[J]. *Diabetes Care*, 2005, 28 (10): 2472–2479.
- [8] Slyepchenko A, Maes M, Machado-Vieira R, et al. Intestinal dysbiosis, gut hyperpermeability and bacterial translocation: missing links between depression, obesity and type 2 diabetes[J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22 (80): 6087–6106.
- [9] Farzi A, Hassan AM, Zenz G, et al. Diabetes and mood disorders: multiple links through the microbiota-gut-brain axis[J]. *Mol Aspects Med*, 2019, 66: 80–93.
- [10] Luca M, Di Mauro M, Di Mauro M, et al. Gut microbiota in Alzheimer's disease, depression, and type 2 diabetes mellitus: the role of oxidative stress[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 4730539.
- [11] Yang QQ, Shao D, Li J, et al. Positive association between serum levels of high-sensitivity C-reactive protein and depression/anxiety in female, but not male, patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Biol Res Nurs*, 2020, 22 (2): 178–187.
- [12] Golden SH, Lazo M, Carnethon M, et al. Examining a bidirectional association between depressive symptoms and diabetes[J]. *JAMA*, 2008, 299 (23): 2751–2759.
- [13] Ren M, Zhang H, Qi J, et al. An Almond-based low carbohydrate diet improves depression and glycometabolism in patients with type 2 diabetes through modulating gut microbiota and GLP-1: a randomized controlled trial[J]. *Nutrients*, 2020, 12 (10): 3036.
- [14] 张燕, 过伟峰, 杜琳琳. 柴胡加龙骨牡蛎汤治疗情志病[J]. *中医学报*, 2021, 36 (8): 1616–1618.
- [15] 王钦, 蔡萧君, 李宇, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤对慢性应激抑郁大鼠海马 BDNF/TrkB/CREB 通路的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27 (21): 37–46.
- [16] 王钦, 蔡萧君, 颜彦鹏, 等. 基于 BDNF/TrkB/CREB 通路探讨柴胡加龙骨牡蛎汤对 2 型糖尿病合并抑郁大鼠海马的影响及其机制研究[J]. *中药材*, 2021, 44 (12): 2939–2944.
- [17] 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]. *中华糖尿病杂志*, 2021, 13 (4): 315–409.
- [18] 中华医学会精神病学分会. 中国精神障碍分类与诊断标准第三版 [J]. *中华精神科杂志*, 2001, 34 (3): 184–188.
- [19] Hamilton M. A rating scale for depression[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1960, 23 (1): 56–62.
- [20] 郑筱萸主编. 中药新药临床研究指导原则 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 233–237.
- [21] 国家中医药管理局. 中医病证诊断疗效标准 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2019: 33–41.
- [22] 中国营养学会. 中国糖尿病膳食指南 (2017) [EB/OL]. (2018–12–31) [2022–06–30]. <https://www.cnsoc.org/acadconfn/70172120196.html>.
- [23] 刘焱, 李月, 刘怡. 乌灵胶囊联合氟西汀胶囊治疗心肾不交型 2 型糖尿病伴情绪障碍的临床效果 [J]. *中国医药导报*, 2019, 16 (34): 122–125.
- [24] Dunstan DA, Scott N, Todd AK. Screening for anxiety and depression: reassessing the utility of the Zung scales [J]. *BMC Psychiatry*, 2017, 17 (1): 329.
- [25] 刘晓倩, 杨宇峰, 石岩. 糖尿病合并抑郁症中医病因病机理论框架研究 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2022, 24 (2): 162–165.
- [26] 郑腊萍. 从肝脾论治消渴郁证 [J]. *中医药临床杂志*, 2020, 32 (10): 1819–1821.
- [27] Zhong J, Li G, Xu H, et al. Baicalin ameliorates chronic mild stress-induced depression-like behaviors in mice and attenuates inflammatory cytokines and oxidative stress[J]. *Braz Med Biol Res*, 2019, 52 (7): e8434.
- [28] Liu J, Zhang T, Wang Y, et al. Baicalin ameliorates neuropathology in repeated cerebral ischemia-reperfusion injury model mice by remodeling the gut microbiota[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12 (4): 3791–3806.
- [29] Hoogendoorn CJ, Roy JF, Gonzalez JS. Shared dysregulation of homeostatic brain-body pathways in depression and type 2 diabetes[J]. *Curr Diab Rep*, 2017, 17 (10): 90.
- [30] Huang J, Guan B, Lin L, et al. Improvement of intestinal barrier function, gut microbiota, and metabolic endotoxemia in type 2 diabetes rats by curcumin[J]. *Bioengineered*, 2021, 12 (2): 11947–11958.
- [31] Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance[J]. *Diabetes*, 2007, 56 (7): 1761–1772.
- [32] Regan T, Gill AC, Clohisey SM, et al. Effects of anti-inflammatory drugs on the expression of tryptophan-metabolism genes by human macrophages[J]. *Leukoc Biol*, 2018, 103 (4): 681–692.
- [33] Grenham S, Clarke G, Cryan JF, et al. Brain–gut–microbe communication in health and disease[J]. *Front Physiol*, 2011, 2: 94.
- [34] Kelly JR, Borre Y, O'Brien C, et al. Transferring the blues: depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat[J]. *J Psychiatr Res*, 2016, 82: 109–118.
- [35] Jiang H, Ling Z, Zhang Y, et al. Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder[J]. *Brain Behav Immun*, 2015, 48: 186–194.

(收稿: 2022-07-22 在线: 2023-08-07)

责任编辑: 汤 静