DOI:10.12441/spyswjs.20240421001 [文章编号] 1673-1689(2024)10-0065-13

益生菌-维生素D-肌醇对小鼠妊娠期糖尿病的协同改善作用

兰潇文 赵建新 陈 卫 杨 波*

(江南大学食品学院,江苏 无锡 214122)

摘要:多种膳食因子包括益生菌、维生素D、肌醇对妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus,GDM)具有缓解作用,但是关于膳食因子复配干预GDM的研究则较少报道。作者将膳食因子进行复配,通过调节多种代谢途径,以应对与GDM相关的复杂代谢紊乱。以高脂饮食+链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)诱导形成GDM小鼠模型,益生菌的剂量为5×10^8 CFU/d,维生素D的剂量为5 μg/(kg·d),肌醇的剂量为100 mg/(kg·d)。结果显示,相比于单独的益生菌干预或两两复配干预,3种膳食因子复配调节小鼠肠道菌群及缓解炎症、氧化应激、内质网应激、肝脏糖脂代谢紊乱、胰岛损伤的作用更加显著,并能够改善血糖与胰岛素稳态。3种膳食因子通过共同调控多种代谢途径,从而发挥协同增效的作用,实现了更佳的健康效益。

关键词:妊娠期糖尿病;益生菌;维生素D;肌醇;复配干预

Synergistic Effects of Probiotic-Vitamin D-Inositol Combination Intervention on Gestational Diabetes Mellitus on Mice

*LAN Xiaowen ZHAO Jianxin CHEN Wei YANG Bo**

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Various dietary factors, including probiotics, vitamin D, and inositol, have been shown to alleviate gestational diabetes mellitus (GDM). However, research on the combined intervention of these dietary factors for GDM remains limited. The author aimed to combine these dietary factors and modulate various metabolic pathways to address the complex metabolic disturbances associated with GDM. A GDM mouse model was induced by streptozotocin (STZ) combined with a high-fat diet. The dosage was 5×10^8 CFU/d for probiotics, 5 μg/(kg·d) for vitamin D, and 100 mg/(kg·d) for inositol. The results indicated that, compared to individual probiotic interventions or pairwise combinations, the three-component dietary intervention more effectively regulated the gut microbiome, alleviated inflammation, oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and disturbances in hepatic glucose and lipid metabolism, as well as pancreatic damage, and improved glucose and insulin homeostasis. This supports the hypothesis that the synergistic effects of these three dietary factors, through their joint regulation of multiple metabolic pathways, can lead to improved health outcomes and greater economic benefits.

Keywords: gestational diabetes mellitus; probiotics; vitamin D; inositol; compound intervention

GDM是一种在妇女妊娠期间由于炎症和胰 岛素抵抗而导致的高血糖症,其全球标准化患病

基金项目:国家自然科学基金创新群体项目(32021005)。

通信作者:杨波(1985—),男,博士,研究员,博士研究生导师,主要从事益生菌的理论与技术研究。E-mail:bo.yang@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2024-04-21 **修回日期:**2024-05-20

率约为14%，而且受到现代生活模式的影响，如妊娠年龄增加、久坐、缺乏运动等，这一数字还在持续上升[1-2]。GDM孕妇的短期妊娠风险（如死产、早产、巨大儿、新生儿低血糖、新生儿高胆红素血症等）与长期风险（如亲代与子代的肥胖、胰岛素抵抗、糖耐量异常等）均比健康孕妇高。以膳食干预与体质量管理为主的生活方式干预是GDM管理的重要组成部分，可以帮助70%～85%的GDM患者实现控糖目标[1]，且具有成本低廉、安全性高、能减少后续医疗费用的优势，因此具有重要的研究意义。

近年来，对GDM病理生理学的相关研究揭示了肠道菌群在其中的关键作用。GDM患者的肠道菌群组成与非GDM个体不同[3-4]，这种菌群环境改变与GDM相关的代谢和炎症有重要联系。因此，用于恢复肠道健康与菌群结构的益生菌产品在GDM治疗中有很好的应用前景[5]。

益生菌可能通过产生短链脂肪酸来抑制糖尿病，其作用途径包括增强胰高血糖素样肽-1（glucagon-like peptide-1，GLP-1）的分泌并刺激胰岛素释放，以及增强肠道屏障并抑制炎症。此外，维生素D可以通过调节胰岛钙信号传导和发挥抗炎作用来改善胰岛素的分泌[6-7]。同时，已有研究表明肌醇能通过改善胰岛素信号传导来辅助治疗GDM[8]。因此膳食因子的联合干预可能通过调节多种代谢途径发挥协同增效作用，从而改善GDM。

现有关于益生菌改善GDM的临床研究均使用了包括乳杆菌属和双歧杆菌属的多株菌[9]，这可能是由于多菌株制剂能通过多样且互补的作用机制产生更好的降血糖效果[10]。作者所在课题组前期的一项荟萃分析结果表明，与单菌株相比，多株菌降低2型糖尿病患者空腹血糖水平的效果更好[10]。这些研究结果证实了多株益生菌在干预糖尿病及相关疾病方面的潜力。此外，作者所在课题组前期已经筛选出多株具有显著缓解2型糖尿病症状的优势菌株，比如*B. bifidum* CCFM1063、*L. plantarum* CCFM0236和*L. rhamnosus* CCFM0528[11]。

以上研究表明，膳食因子的复配干预可更好地发挥改善GDM的作用，然而目前关于膳食因子复配干预GDM的研究较少。因此，作者提出了1种膳食补充剂配方，将3株益生菌与维生素D和肌醇结合，用于干预GDM小鼠。旨在通过调节多种代谢途径，应对与GDM相关的复杂代谢紊乱，从而发挥协同增效作用改善小鼠GDM，实现更佳的健康效益。此外，该方案符合患者对膳食补充剂而非复杂饮食模式的偏好。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌株*B. bifidum* CCFM1063、*L. plantarum* CCFM0236、*L. rhamnosus* CCFM0528：江南大学食品生物技术中心保存。

小鼠：北京维通利华公司，7周龄且无特定病原体的C57BL/6J，其中雌性小鼠84只，体质量18 g左右；雄性小鼠42只，体质量20 g左右。

脂肪能量占比为10%的低脂对照饲料和脂肪能量占比为60%的高脂饲料（HFD）：南通特洛菲饲料科技有限公司。

STZ：美国Sigma公司；二甲双胍：阿拉丁试剂有限公司；小鼠胰岛素、GLP-1、谷胱甘肽（glutathione，GSH）、GSH-Px、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、丙二醛（malondialdehyde，MDA）、肝糖原、肝甘油三酯（triglyceride，TG）检测试剂盒：湖北Elabscience公司；小鼠糖化血红蛋白（glycated hemoglobin，HbA1c）、脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）、Occluding、ZO-1、Claudin-1、Claudin-3检测试剂盒：南京森贝伽公司；小鼠白介素IL-4、IL-6、IL-8、IL-10检测试剂盒：美国R&D公司；小鼠总蛋白质测定试剂盒：上海碧云天公司；葡萄糖转运蛋白4（glucose transporter 4，GLUT4）抗体：美国proteintech公司；β-actin抗体：美国Abcam公司；HRP标记的抗体IgG：湖北赛维尔公司；TRIzol试剂：ABI公司；逆转录cDNA试剂盒：康为世纪生物科技有限公司；PCR扩增引物及合成序列：上海生工生物工程有限公司；粪便基因组提取试剂盒：美国MP公司；胶纯化回收试剂盒：德国Qiagen公司；双链DNA测定试剂盒：美国Life Technologies公司。

1.2 仪器与设备

罗氏活力型血糖仪：智航型，罗氏有限公司；台式高速冷冻离心机：5415R型，德国Eppendorf公司；生化分析仪：2100型，美国Agilent科技有限公司；恒温厌氧工作站：AW500SG-7152型，德国

LEICA公司；多功能酶标仪：3020型，美国Thermo公司；凝胶成像系统：Gel Doc™ EZ imager型，美国Bio-Rad公司。

1.3　方法

1.3.1　复配溶液的制备

在添加了质量分数0.05%的*L*-半胱氨酸盐酸盐的MRS培养基中进行菌株培养，无氧条件下37 ℃孵育24 h。经过3轮扩大培养后，以8 000 *g*离心15 min分离菌株与培养基，然后用无菌磷酸盐缓冲液（pH 7.4）冲洗3次，将菌株悬浮在体积分数30%的甘油溶液中，−80 ℃冻存。在灌胃前离心弃去甘油，使菌株重悬在生理盐水溶液中，制备成2×10^{10} CFU/mL的菌悬液。将各菌悬液混合，并添加花生油和大豆卵磷脂（50 g/L）以溶解维生素D。

1.3.2　动物试验设计

小鼠饲养在江南大学实验动物中心，饲养温度保持在（23±2）℃，相对湿度保持在（50±10）%，12 h光照与12 h黑暗交替，自由进食。适应性喂养7 d后，所有小鼠被随机分为7组，包括对照组（A组）、模型组（B组）、二甲双胍组（C组）、益生菌+维生素D+肌醇组（D组）、益生菌组（E组）、益生菌+维生素D组（F组）和益生菌+肌醇组（G组），考虑到肥胖对妊娠成功率的影响，每组设置12只小鼠（见表1）。小鼠在配对前28 d和妊娠期间食用HFD（脂肪供能占比为60%）。对照组小鼠在同一时期食用低脂对照饲料。雌性与雄性小鼠以数量比2∶1放置在各个笼子过夜配对，通过第2天早晨检查阴道栓来确认是否怀孕，并定义为妊娠第0.5天。第2天，腹腔注射溶解在柠檬酸缓冲液（pH 4.2~4.5）中的STZ，剂量为30 mg/kg，然后每隔24 h注射1次，共3次，对照组小鼠注射等量的柠檬酸缓冲液[12]。对照组和模型组每天灌胃生理盐水，其余各组每天灌胃相应的混合溶液0.2 mL。动物研究过程按照伦理指南进行，并获得了江南大学实验动物伦理委员会的批准，批准号：JN. No 20230315c1380610[080]。

1.3.3　血糖测定

在妊娠第10.5天、第14.5天、第18.5天检测空腹血糖，小鼠禁食不禁水6 h，然后采用尾部取血的方式检测血糖。在妊娠第17.5天，进行口服葡萄糖耐量试验，经过6 h禁食，按照1.5 g/kg灌胃质量分数30%的葡萄糖溶液。随后分别在灌胃葡萄糖后的0、30、60、90、120 min从尾静脉取血。

表1　小鼠饲养方案

Table 1　Mice feeding protocol

组别	二甲双胍	益生菌	维生素D	肌醇
A组	−	−	−	−
B组	−	−	−	−
C组	+	−	−	−
D组	−	+	+	+
E组	−	+	−	−
F组	−	+	+	−
G组	−	+	−	+

注："−"表示不包含该成分；"+"表示包含该成分；二甲双胍每日灌胃剂量为200 mg/kg；益生菌*B. bifidum* CCFM1063、*L. plantarum* CCFM0236、*L. rhamnosus* CCFM0528的每日灌胃剂量均为5×10^{8} CFU；维生素D每日灌胃剂量为5 μg/kg；肌醇每日灌胃剂量为100 mg/kg。

1.3.4　样本采集与处理

在妊娠第17.5天，采集新鲜粪便样品用于高通量测序。妊娠第18.5天，在禁食6 h后，按照0.005 mL/g的用量采用质量浓度为1 g/L的戊巴比妥钠溶液对小鼠进行腹腔注射，取血后辅以颈椎脱臼致死。血液经3 000 r/min离心15 min后，收集上层血清，转移至−80 ℃冰箱保存备用；取肝脏、胰腺和结肠组织并分成2份，1份保存在多聚甲醛溶液中用于制作病理切片，1份置于−80 ℃保存备用。

1.3.5　血清生化指标测定

胰岛素、HbA1c、LPS、GLP-1均按照试剂盒说明书的方法测定。血脂4项指标包括总胆固醇（total cholesterol，TC）、TG、高密度脂蛋白胆固醇（high-density lipoprotein cholesterol，HDL-C）和低密度脂蛋白胆固醇（low-density lipoprotein cholesterol，LDL-C），均用生化分析仪测定。

1.3.6　肝脏生化指标测定

肝糖原、肝脏TG、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、GSH、GSH-Px、SOD、MDA均按照试剂盒说明书的方法测定。

1.3.7　结肠生化指标测定

Clauding-1、Clauding-3、ZO-1、Occludin均按照试剂盒说明书的方法测定。

1.3.8　组织病理学分析

按照李向菲[13]的方法，用多聚甲醛溶液固定胰腺、肝脏组织，固定的组织洗涤后，经脱水、透明、浸蜡、包埋、切片，然后对组织进行H&E染色。

1.3.9 基因转录水平测定

通过PrimerBank得到小鼠目标基因的引物序列（见表2）。按照司倩[14]的方法提取总RNA、合成cDNA，并进行实时荧光定量PCR检测。

表2 引物序列

Table 2 Primer sequence

基因	正向序列（5′—3′）	反向序列（5′—3′）
Bax	AGGATGCGTCCACCAAGAAGCT	TCCGTGTCCACGTCAGCAATCA
Bcl-2	CCTGTGGATGACTGAGTACCTG	AGCCAGGAGAAATCAAACAGAGG
Caspase-3	GGAGTCTGACTGGAAAGCCGAA	CTTCTGGCAAGCCATCTCCTCA
GSK3β	GAGCCACTGATTACACGTCCAG	CCAACTGATCCACACCACTGTC
IRE1	GCCACATCACTGCCTTCAGCAC	GCCACATCACTGCCTTCAGCAC
CHOP	GCCACATCACTGCCTTCAGCAC	GCTCCTCTGTCAGCCAAGCTAG
Caspase-12	GCTCCTCTGTCAGCCAAGCTAG	CTAATTCCCGGGAAAAAGGTAG
GRP78	CTAATTCCCGGGAAAAAGGTAG	CCAACACTTCCTGGACAGGCTT
β-actin	CATTGCTGACAGGATGCAGAAGG	CATTGCTGACAGGATGCAGAAGG

1.3.10 Western blot分析

通过Western blot确定肝组织中GLUT4的蛋白质表达量。按照试剂盒说明书的方法将蛋白质裂解与变性；用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质；用PVDF膜转移目的蛋白质；用BSA封闭蛋白质，再用TBST清洗。将含有目的蛋白质的PVDF膜与一抗在4 ℃摇床孵育过夜并用TBST清洗，然后与二抗孵育1 h，清洗后加入显影液孵育片刻，用凝胶成像系统成像。

1.3.11 肠道菌群分析

按照姜金池[15]的方法提取粪便DNA、扩增V3—V4区、对PCR产物进行胶回收、混样、构建文库、测序以及生物信息学分析。粪便中的微生物多样性通过在线分析获得。其中，α多样性通过Chao1、Shannon和Simpson指数进行评估，β多样性通过主坐标分析（PCoA）进行可视化（https://www.microbiomeanalyst.ca/）。门与属水平的各组标志微生物特征通过LEfSe分析确定（https://www.bioincloud.tech/）。

1.3.12 数据统计与分析

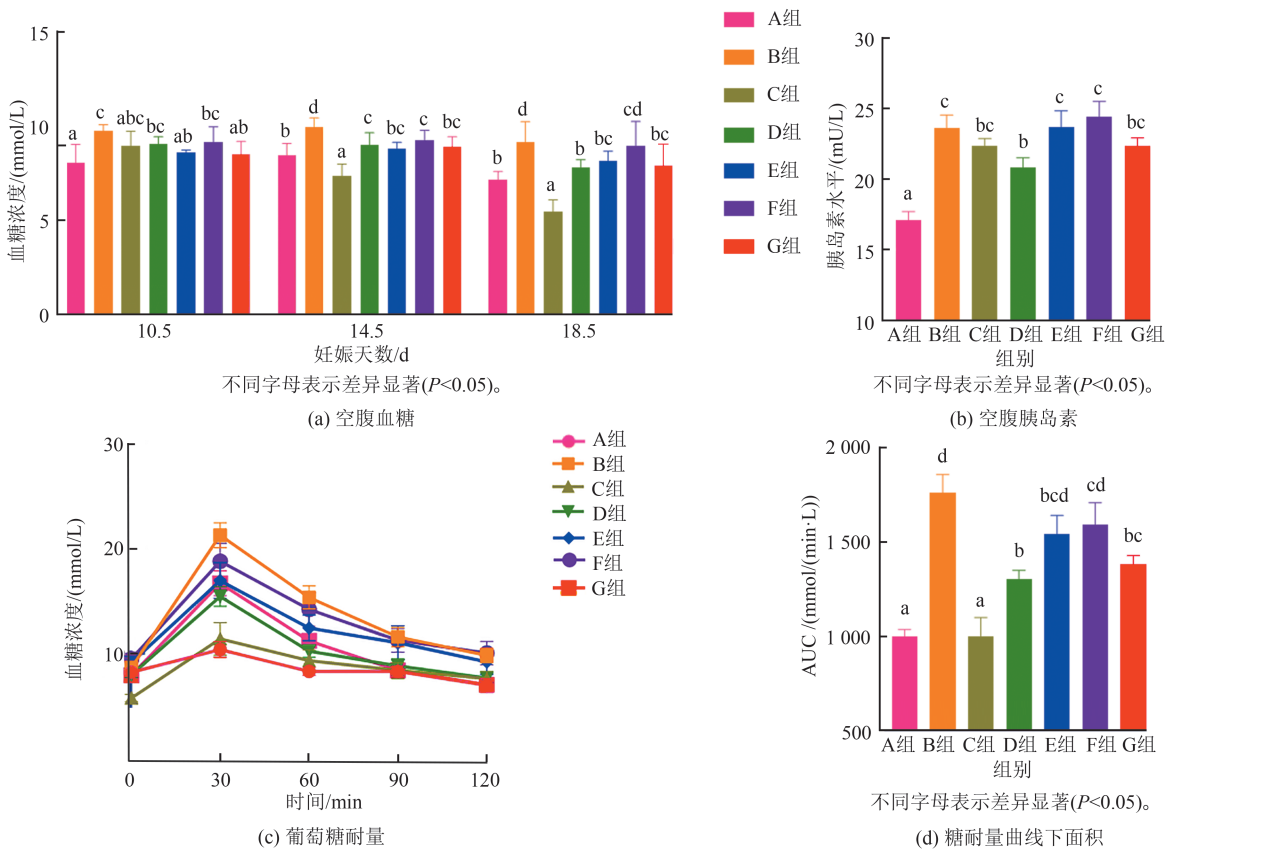
数据采用平均值±标准误差表示，使用GraphPad Prism 8绘图。使用SPSS（22版）进行One-Way ANOVA显著性分析，$P<0.05$表示差异显著。使用ImageJ 1.8.0软件分析Western blot结果。

2 结果与讨论

2.1 膳食配方对GDM小鼠表观病理指标的缓解作用

GDM患者由于严重的胰岛素抵抗（insulin resistance，IR）会导致空腹血糖与空腹胰岛素升高，且葡萄糖耐量降低。因此测定小鼠空腹血糖、空腹胰岛素与葡萄糖耐量可以揭示膳食配方对GDM的缓解作用。如图1所示，与A组相比，B组小鼠妊娠18.5 d的空腹血糖与空腹胰岛素水平均显著升高，成功模拟了人类GDM的病理特征。与B组相比，D组干预明显降低了妊娠18.5 d的空腹血糖、空腹胰岛素水平与葡萄糖耐量；G组干预与C组干预均降低了妊娠18.5 d的空腹血糖水平与葡萄糖耐量。可见，D组干预效果最好，能使妊娠后期的空腹血糖下调约15%，而C组干预能使空腹血糖下调约50%。

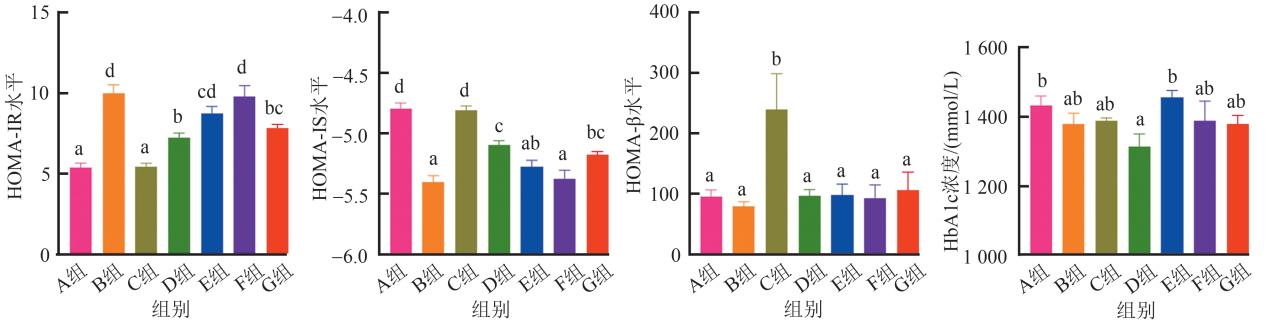
HbA1c是红细胞中的血红蛋白与血清中的糖通过非酶反应相结合的产物，该反应具有持续、缓慢、不可逆的特点；HOMA-IR是评价IR水平的指标；HOMA-IS是评价胰岛素敏感性的指标；HOMA-β是评价胰岛β细胞功能的指标。因此，可通过这些指标表征膳食配方对血糖与胰岛素稳态的缓解作用。如图2所示，与B组相比，D组、G组、C组均显著降低了妊娠第18.5天的HOMA-IR，并提高了HOMA-IS水平（$P<0.05$）。然而膳食配方并没有显著下调HbA1c水平，这可能是由于小鼠的GDM持续时间较短。



不同字母表示差异显著(P<0.05)。
(a) 空腹血糖
不同字母表示差异显著(P<0.05)。
(b) 空腹胰岛素
(c) 葡萄糖耐量
不同字母表示差异显著(P<0.05)。
(d) 糖耐量曲线下面积

图1　膳食配方对GDM小鼠血糖与胰岛素稳态的影响

Fig. 1　Effect of dietary formulations on blood glucose and insulin homeostasis in GDM mice



不同字母表示差异显著(P<0.05)。
(a) HOMA-IR
不同字母表示差异显著(P<0.05)。
(b) HOMA-IS
不同字母表示差异显著(P<0.05)。
(c) HOMA-β
不同字母表示差异显著(P<0.05)。
(d) HbA1c

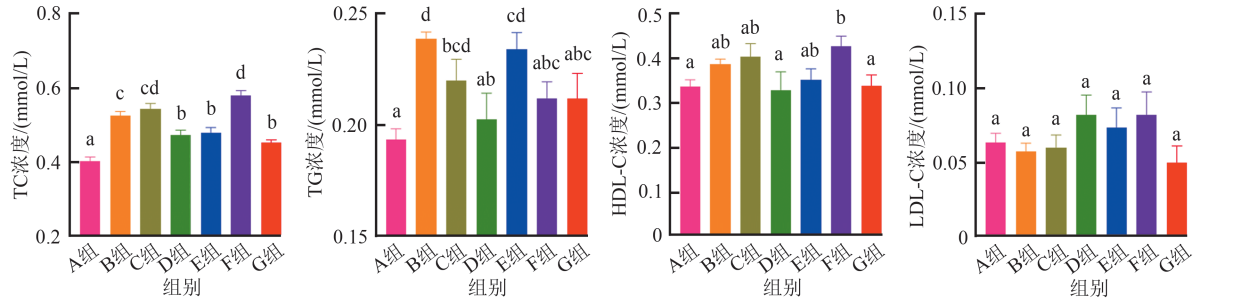
图2　膳食配方对GDM小鼠胰岛素稳态与HbA1c水平的影响

Fig. 2　Effect of dietary formulations on insulin homeostasis and HbA1c levels in GDM mice

血脂异常是小鼠GDM的重要诱因，具体表现为LDL-C、TC、TG水平的升高及HDL-C水平的降低。如图3所示，与B组相比，D组和G组干预均能显著降低血清TC和TG水平（P<0.05）。而E组和F组的干预效果较弱。该膳食配方对HDL-C和LDL-C水平无显著影响。

2.2　膳食配方对GDM小鼠肝脏糖脂代谢紊乱与胰岛损伤的缓解作用

小鼠的GDM源于高脂饮食引起的胰岛素敏感性降低。鉴于肝脏在机体糖脂代谢稳态中的关键作用，通过分析肝脏糖脂代谢来研究膳食配方对GDM的缓解作用。

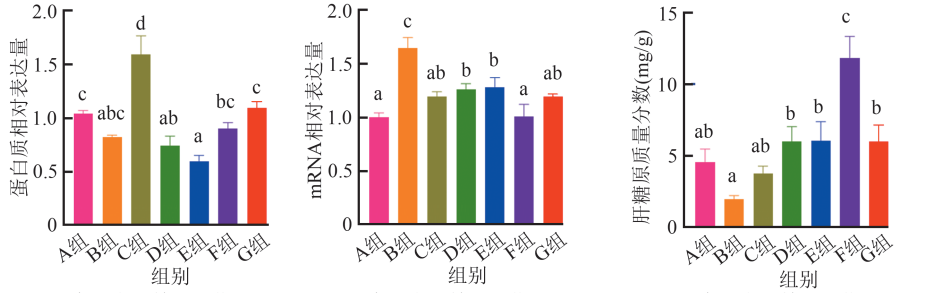


不同字母表示差异显著(P<0.05)。(a) TC　不同字母表示差异显著(P<0.05)。(b) TG　不同字母表示差异显著(P<0.05)。(c) HDL-C　不同字母表示差异显著(P<0.05)。(d) LDL-C

图 3　膳食配方对 GDM 小鼠血脂的影响

Fig. 3　Effect of dietary formulations on serum lipids in GDM mice

GLUT4 是参与葡萄糖摄取和糖原合成的胰岛素信号受体[16]，可反映胰岛素敏感性，因此通过 GLUT4 表达量表征膳食配方对胰岛素信号通路的影响。如图 4 所示，B 组的 GLUT4 相对表达量略有下降；而 F 组和 G 组干预能轻微逆转这种下降；C 组干预显著提高了该蛋白质的表达量（P<0.05）。*GSK3β* 基因抑制糖原合成，而肝糖原质量分数可反映糖原合成程度[17]。因此通过测定 *GSK3β* 基因表达和肝糖原质量分数来表征其对肝糖原合成的影响。所有干预均能显著下调 *GSK3β* 基因的表达，并增加肝糖原质量分数（P<0.05）。



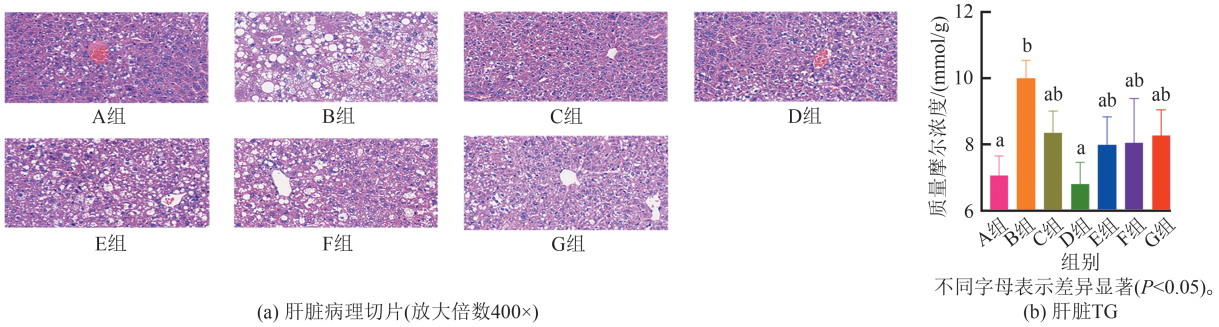
不同字母表示差异显著(P<0.05)。(a) GLUT4　不同字母表示差异显著(P<0.05)。(b) *GSK3β*基因　不同字母表示差异显著(P<0.05)。(c) 肝糖原

图 4　膳食配方对 GDM 小鼠糖原合成的影响

Fig. 4　Effect of dietary formulations on glycogen synthesis in GDM mice

TG 质量摩尔浓度和 H&E 染色组织切片可以反映肝脏脂质代谢紊乱的程度。因此通过组织病理切片与 TG 质量摩尔浓度来表征膳食配方对肝脏脂质代谢的影响，结果见图 5。根据 H&E 染色结果，与 A 组相比，B 组表现出大范围的肝细胞脂肪变性，其特征是存在许多不同大小的细胞质圆形空泡。各组干预能够在不同程度上减少这些圆形空泡的数量，其中 C 组和 D 组干预减少这些圆形空泡数量的效果较明显。此外，B 组表现出严重的肝脏 TG 积累，D 组干预显著降低了肝脏 TG 质量摩尔浓度（P<0.05），而其他干预组没有明显改善作用。

胰岛细胞凋亡也是高血糖的诱因。Bcl-2 相关 X 蛋白（Bcl-2-associated X protein，Bax）和半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶（cysteine-aspartic proteases，Caspase）-3 可促进细胞凋亡，而 B 细胞淋巴瘤-2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）可抑制细胞凋亡[18]。此外胰腺组织的 H&E 染色结果也能反映胰岛细胞的凋亡程度。因此通过 *Bcl-2*、*Bax* 和 *Caspase-3* 基因的表达与胰腺组织病理切片来表征膳食配方对胰岛细胞凋亡的保护作用。如图 6 所示，除 G 组外，其余干预组均显著下调了 *Bax* 的表达（P<0.05）。而只有 C 组和 E 组干预显著上调 *Bcl-2* 基因的表达（P<0.05）。根据 H&E 染色结果，与 A 组相比，B 组表现出明显的胰岛细胞萎缩，胰岛细胞与外分泌腺的边界高度模糊且不规则。所有干预措施都能不同程度逆转这些变化，而 C 组干预和 G 组干预的胰岛细胞形态维持得最好。

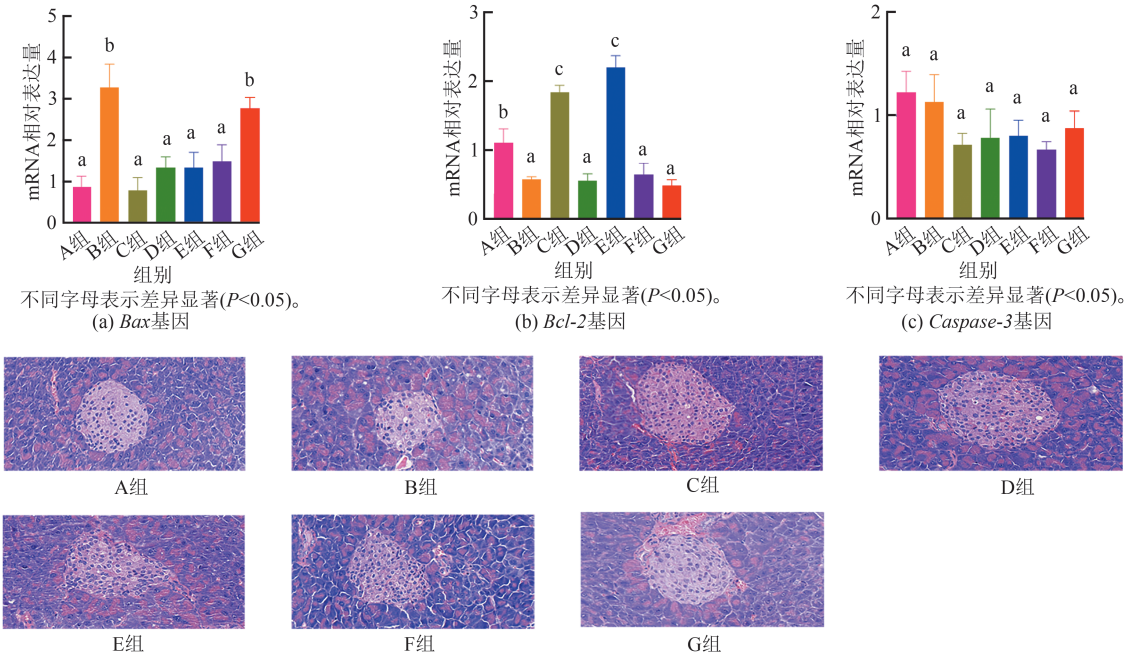


(a) 肝脏病理切片(放大倍数400×)

不同字母表示差异显著(P<0.05)。
(b) 肝脏TG

图5　膳食配方对GDM小鼠脂质代谢紊乱的影响

Fig. 5　Effect of dietary formulations on lipid metabolism disturbances in GDM mice



不同字母表示差异显著(P<0.05)。
(a) *Bax*基因

不同字母表示差异显著(P<0.05)。
(b) *Bcl-2*基因

不同字母表示差异显著(P<0.05)。
(c) *Caspase-3*基因

(d) 胰腺病理切片(放大倍数400×)

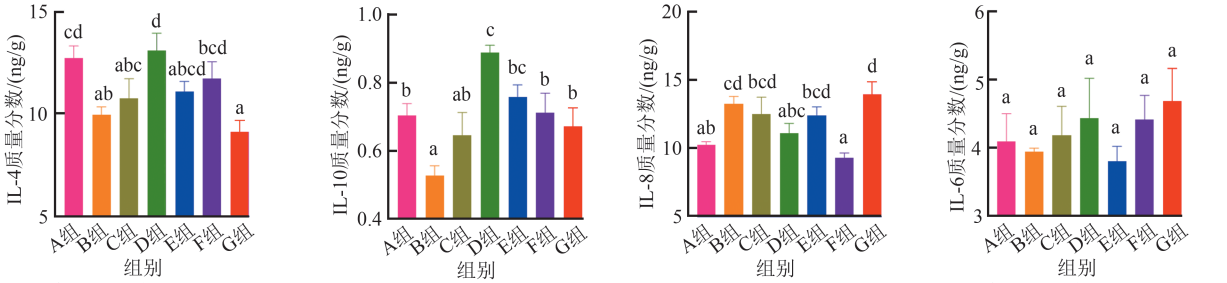
图6　膳食配方对GDM小鼠胰岛细胞凋亡的影响

Fig. 6　Effect of dietary formulations on pancreatic islet cell apoptosis in GDM mice

2.3　膳食配方对GDM小鼠肝脏炎症、氧化应激与胰腺内质网应激的缓解作用

在糖尿病的病程变化中，肝脏和胰腺的损伤和病理变化是由糖脂毒性引起的炎症应激、氧化应激和内质网应激共同介导的。IL-6和IL-8可以诱导胰岛素抵抗，而IL-10和IL-4与胰岛素抵抗有负相关作用[19-20]。因此通过测量IL-4、IL-10、IL-8和IL-6的水平来表征膳食配方对炎症的调节作用。如图7所示，D组干预效果最好，可显著上调IL-4和IL-10水平(P<0.05)。其次是F组干预，其可上调IL-4水平，并显著下调IL-8水平(P<0.05)。然而，高脂饮食+STZ处理对IL-6水平没有显著影响。

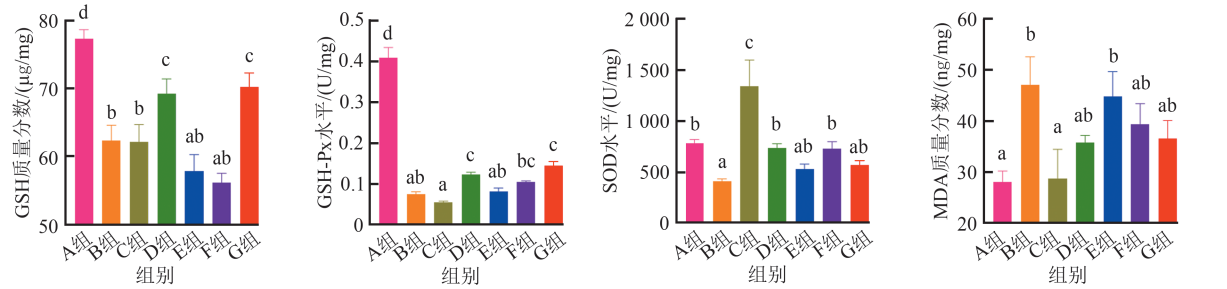
GSH、GSH-Px和SOD等是抗氧化物质，而MDA是脂质过氧化的产物，其可反映体内脂质的过氧化程度[21]。因此通过测定GSH、GSH-Px、SOD和MDA水平来表征膳食配方对氧化应激的调节作用。如图8所示，D组干预效果最好，显著上调了GSH、GSH-Px和SOD的水平(P<0.05)，而对MDA的下调效果不显著。其次是G组干预，能显著上调GSH和GSH-Px水平(P<0.05)。



不同字母表示差异显著(P<0.05)。
(a) IL-4　(b) IL-10　(c) IL-8　(d) IL-6

图 7　膳食配方对 GDM 小鼠肝脏炎症的影响

Fig. 7　Effect of dietary formulations on hepatic inflammation in GDM mice

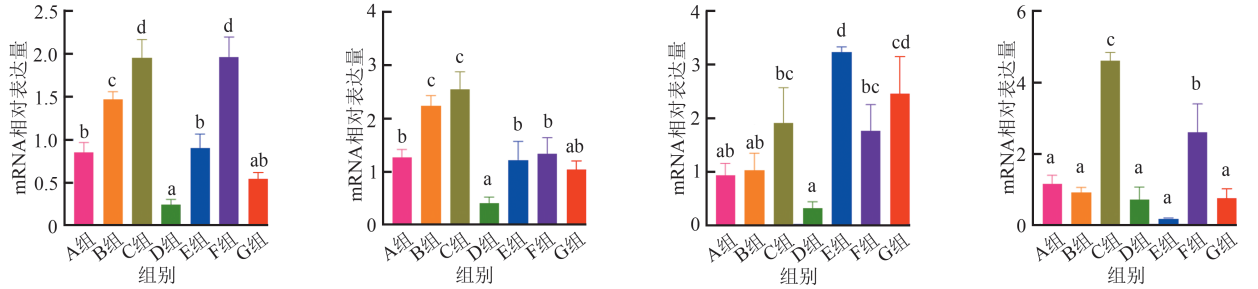


不同字母表示差异显著(P<0.05)。
(a) GSH　(b) GSH-Px　(c) SOD　(d) MDA

图 8　膳食配方对 GDM 小鼠肝脏氧化应激的影响

Fig. 8　Effect of dietary formulations on hepatic oxidative stress in GDM mice

肌醇需求酶 1（immunoglobulin-regulated enhancer 1，IRE1）、C/EBP 同源蛋白（C/EBP homologous protein，CHOP）、Caspase-12 和葡萄糖调节蛋白 78（glucose regulatory protein 78，GRP78）是内质网应激的关键物质，它们的水平可反映内质网应激的程度。因此通过测量胰腺 *IRE1*、*CHOP*、*Caspase-12* 和 *GRP78* 基因的表达来表征膳食配方对内质网应激的调节作用。如图 9 所示，D 组干预效果最好，其次是 G 组干预，两者均能显著下调 *IRE1* 和 *CHOP* 基因的表达（P<0.05）；而高脂饮食+STZ 处理对 *Caspase-12* 和 *GRP78* 基因的表达无显著影响。



不同字母表示差异显著(P<0.05)。
(a) *IRE1*基因　(b) *CHOP*基因　(c) *Caspase-12*基因　(d) *GRP78*基因

图 9　膳食配方对 GDM 小鼠胰腺内质网应激的影响

Fig. 9　Effect of dietary formulations on pancreatic endoplasmic reticulum stress in GDM mice

2.4　膳食配方对 GDM 小鼠肠道菌群的影响

肠道菌群与 GDM 相关的炎症和代谢紊乱相关联，因此通过测量肠道菌群结构来表征膳食配方改善 GDM 的作用途径。Shannon、Chao1 和

Simpson指数反映样本的α多样性；PCoA指数反映样本的β多样性，两者共同反映样本含有的物种数目，值越大，表示物种的丰富度越高[11]。然而，高脂饮食+STZ处理对α多样性没有显著影响，见图10。此外，门水平的肠道菌群结构在各组间也无显著差异。该结果与文献[22]结果一致。

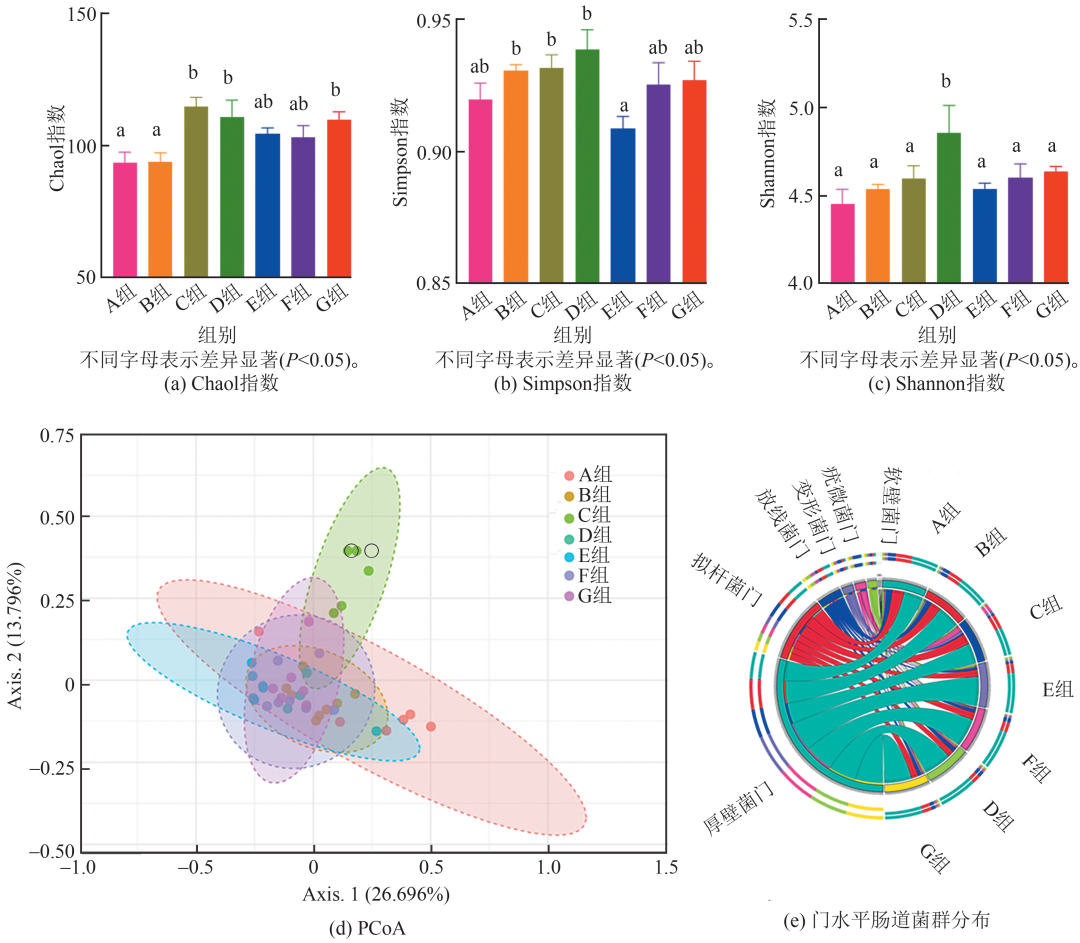


图10　膳食配方对GDM小鼠肠道菌群多样性的影响

Fig. 10　Effect of dietary formulations on gut microbiome diversity in GDM mice

作者进一步测定了GDM小鼠肠道菌群属水平的变化。许多特定菌属的相对丰度，包括*Ruminiclostridium* 9、*Romboutsia*、*Lachnoclostridium*、*Lactobacillus*、*Lachnospiraceae* NK4A136 group、*Bifidobacterium*、*Coprococcus*、*Eubacterium nodatum* group、*Lachnospiraceae* UCG-006、*Odoribacter*、*Oscillibacter*、*Parabacteroides*、*Parvibacter*和*Ruminococcaceae* UCG-014，与炎症和肥胖成反比[23-31]。通过LEfSe分析确定了不同组间的潜在差异菌群（见图11）。在相对丰度最高的前20个菌群中（见图12），B组和D组小鼠肠道*Ruminiclostridium* 9的相对丰度显著增加，其余干预组均上调了该菌群的相对丰度（$P<0.05$）。D组和F组干预显著上调了*Romboutsia*的相对丰度，G组干预显著上调了*Lachnospiraceae* NK4A136 group的相对丰度（$P<0.05$）。

如图13所示，在低相对丰度的差异属中，B组小鼠中*Odoribacter*和*Parvibacter*的相对丰度显著降低，D组干预显著逆转了*Odoribacter*相对丰度的降低（$P<0.05$），而所有干预对*Parvibacter*的相对丰度均无显著调节作用。此外，D组和G组干预显著增加了*Oscillibacter*的相对丰度（$P<0.05$）。E组干预显著提高了*Coprococcus*、*Eubacterium nodatum* group和*Parabacteroides*的相对丰度（$P<0.05$）。F组干预显著提高了*Lachnospiraceae* UCG-006和

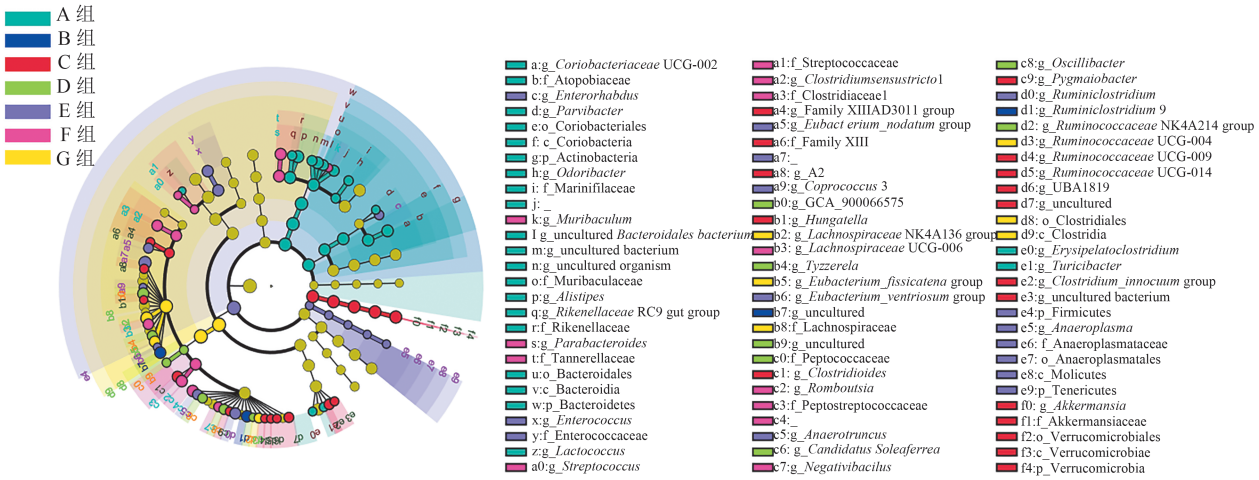


图 11　膳食配方对 GDM 小鼠肠道微生物分布的影响

Fig. 11　Effect of dietary formulations on microbial distribution in the gut of GDM mice

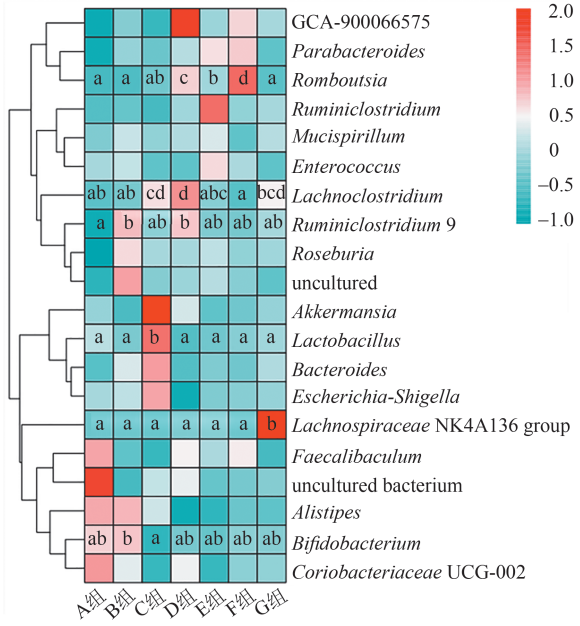


图 12　膳食配方对 GDM 小鼠肠道前 20 个相对丰度最高的微生物属的影响

Fig. 12　Effect of dietary formulations on the top 20 most abundant microbial genera in the gut of GDM mice

Parabacteroides 的相对丰度（$P<0.05$）。

综上所述，GDM 小鼠的肠道有益菌群相对丰度显著下降，而各种干预措施均增加了有益菌群的相对丰度。其他研究报道的 GDM 小鼠及妇女肠道菌群有不同的变化趋势，这可能与环境和种族等影响因素有关[32]。因此，还需要测定这些变化的肠道菌群改善 GDM 的作用途径。肠道有益菌群通过增强肠道屏障来缓解炎症，以及促进 GLP-1 分泌来促进胰岛素分泌。因此作者接下来测定膳食配方对肠道屏障与 GLP-1 分泌的影响。

2.5　膳食配方对 GDM 小鼠肠道屏障损伤的缓解作用

Claudin-1、Claudin-3、ZO-1、Occludin 等紧密连接蛋白是肠道屏障的标志物，而血浆 LPS 水平与肠道通透性呈正相关。因此，通过测定 Claudin-1、Claudin-3、ZO-1、Occludin 与 LPS 水平来表征膳食配方对肠道通透性的影响。如图 14 所示，所有干预组均显著提高了 Claudin-1 质量分数（$P<0.05$）。然而，只有 C 组、D 组和 G 组干预显著提高了 Claudin-3 质量分数（$P<0.05$）。此外，所有干预组均提高了 ZO-1 和 Occludin 质量分数，但差异不显著。除 E 组外，所有干预组均显著降低了血清 LPS 质量分数（$P<0.05$）。B 组小鼠血清中 GLP-1 质量分数显著降低，除 E 组外，其他干预组均显著逆转了下降趋势（$P<0.05$）。总之，尽管各干预措施对特定菌群的影响不一致，但所有干预措施都能改善肠道屏障功能并促进 GLP-1 分泌。

虽然益生菌株 *B. bifidum* CCFM1063、*L. plantarum* CCFM0236 和 *L. rhamnosus* CCFM0528 能有效改善 GDM，但不如先前研究中改善 2 型糖尿病的效果好，可能是由于 2 型糖尿病与 GDM 的肠道菌群特征不同。此外，鉴于 GDM 发病过程中肠道菌群的复杂变化，因此开发专门针对改善 GDM 的益生菌管理策略有重要研究意义。

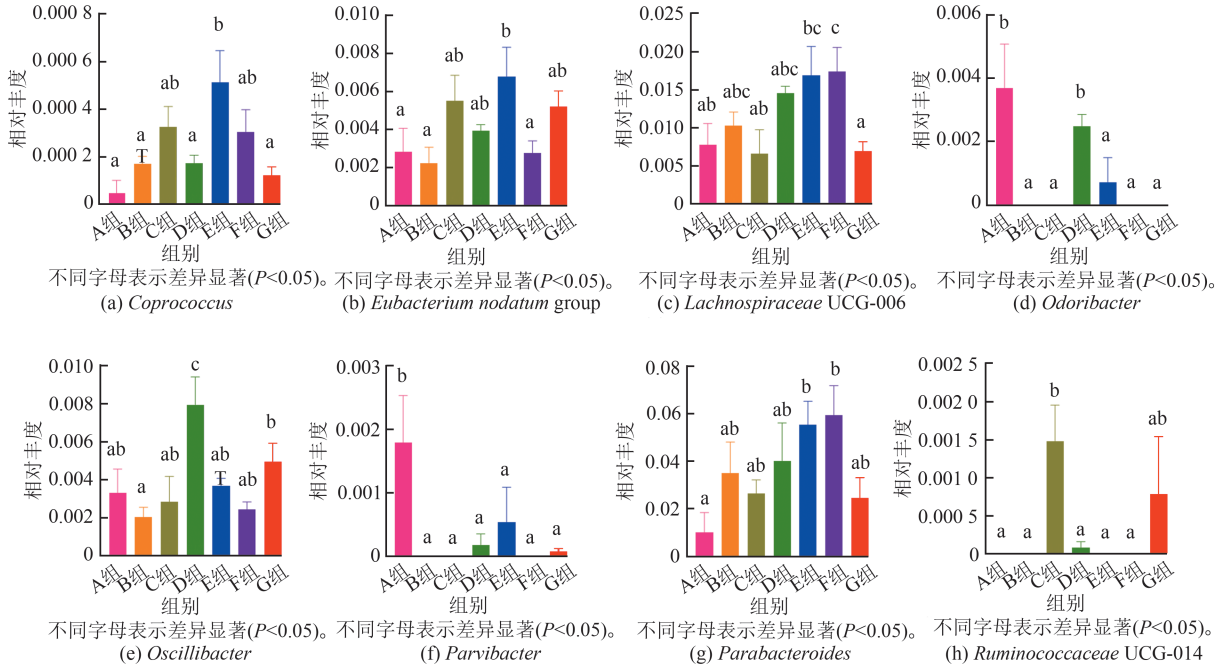


图 13　膳食配方对GDM小鼠肠道低丰度微生物属的影响

Fig. 13　Effect of dietary formulations on low-abundance microbial genera in the gut of GDM mice

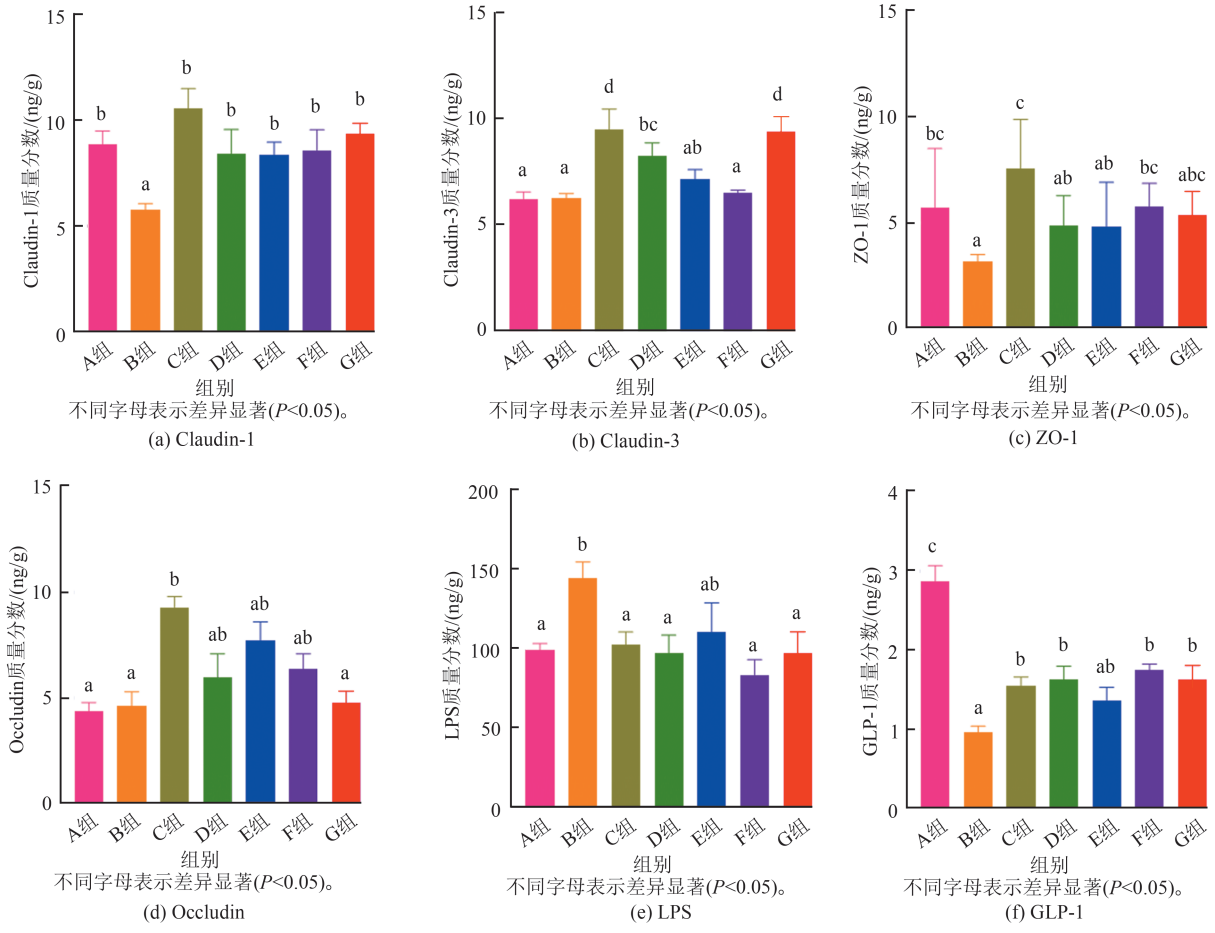


图 14　膳食配方对GDM小鼠肠道屏障损伤的影响

Fig. 14　Effect of dietary formulations on intestinal barrier damage in GDM mice

3 结论

以高脂饮食+STZ诱导的GDM小鼠为模型，探究膳食因子复配对GDM的改善作用。结果显示，相比于单独的益生菌干预或两种膳食因子复配干预，3种膳食因子复配可以更加显著地调节肠道菌群，缓解炎症、氧化应激、内质网应激、肝脏糖脂代谢紊乱、胰岛损伤，并改善血糖与胰岛素稳态。3种膳食因子可通过多种代谢途径共同调控，从而发挥协同增效的作用，实现更好的健康效益。

参考文献

[1] JOHNS E C, DENISON F C, NORMAN J E, et al. Gestational diabetes mellitus: mechanisms, treatment, and complications[J]. Trends in Endocrinology and Metabolism, 2018,29(11):743-754.

[2] WANG H, LI N H, CHIVESE T, et al. IDF Diabetes Atlas: estimation of global and regional gestational diabetes mellitus prevalence for 2021 by International Association of Diabetes in Pregnancy Study Group's criteria [J]. Diabetes Research and Clinical Practice, 2022, 183: 109050.

[3] SUN Z H, PAN X F, LI X, et al. The gut microbiome dynamically associates with host glucose metabolism throughout pregnancy: longitudinal findings from a matched case-control study of gestational diabetes mellitus [J]. Advanced Science, 2023, 10(10): e2205289.

[4] CHEN J, YANG Y Y, YU N N, et al. Relationship between gut microbiome characteristics and the effect of nutritional therapy on glycemic control in pregnant women with gestational diabetes mellitus[J]. PLoS One, 2022, 17(4): e0267045.

[5] ŁAGOWSKA K, MALINOWSKA A M, ZAWIEJA B, et al. Improvement of glucose metabolism in pregnant women through probiotic supplementation depends on gestational diabetes status: meta-analysis [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 17796.

[6] SZYMCZAK-PAJOR I, DRZEWOSKI J, ŚLIWIŃSKA A. The molecular mechanisms by which vitamin D prevents insulin resistance and associated disorders [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(18): 6644.

[7] WU C F, SONG Y, WANG X Y. Vitamin D supplementation for the outcomes of patients with gestational diabetes mellitus and neonates: a meta-analysis and systematic review [J]. International Journal of Clinical Practice, 2023(1): 1907222.

[8] CROZE M L, SOULAGE C O. Potential role and therapeutic interests of *myo*-inositol in metabolic diseases [J]. Biochimie, 2013, 95(10): 1811-1827.

[9] ÇETINKAYA-ÖZDEMIR S, KÜÇÜKTÜRKMEN-PAŞA B, METIN T, et al. The effect of probiotic and synbiotic use on glycemic control in women with gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis[J]. Diabetes Research and Clinical Practice, 2022, 194: 110162.

[10] ZHANG C C, JIANG J C, WANG C, et al. Meta-analysis of randomized controlled trials of the effects of probiotics on type 2 diabetes in adults[J]. Clinical Nutrition, 2022, 41(2): 365-373.

[11] 司倩，焦婷，杨树荣，等. 两歧双歧杆菌缓解II型糖尿病的效果差异及机制分析[J]. 食品与发酵工业，2019，45(22)：12-19.
SI Q, JIAO T, YANG S R, et al. Effects and mechanisms of *Bifidobacterium bifidum* in alleviating type II diabetes [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(22): 12-19.(in Chinese)

[12] YIN Y D, PAN Y H, HE J, et al. The mitochondrial-derived peptide MOTS-c relieves hyperglycemia and insulin resistance in gestational diabetes mellitus [J]. Pharmacological Research, 2022, 175: 105987.

[13] 李向菲. 产胞外多糖乳酸菌对2型糖尿病的干预及其机制研究[D]. 无锡：江南大学，2016.

[14] 司倩. 双歧杆菌缓解2型糖尿病的作用及途径探究[D]. 无锡：江南大学，2021.

[15] 姜金池. 益生菌对高胆固醇血症的缓解作用及机制研究[D]. 无锡：江南大学，2021.

[16] KLIP A, MCGRAW T E, JAMES D E. Thirty sweet years of GLUT4[J]. Journal of Biological Chemistry, 2019, 294(30): 11369-11381.

[17] YU X C, MENG Z Y, FANG T, et al. Empagliflozin inhibits hepatic gluconeogenesis and increases glycogen synthesis by AMPK/CREB/GSK3β signalling pathway [J]. Frontiers in Physiology, 2022, 13: 817542.

[18] SETHI G, RATH P, CHAUHAN A, et al. Apoptotic mechanisms of quercetin in liver cancer: recent trends and advancements[J]. Pharmaceutics, 2023, 15(2): 712.

[19] KUZMICKI M, TELEJKO B, ZONENBERG A, et al. Circulating pro- and anti-inflammatory cytokines in Polish women with gestational diabetes [J]. Hormones et Metabolisme, 2008, 40(8): 556-560.

[20] CHANG Y H, HO K T, LU S H, et al. Regulation of glucose/lipid metabolism and insulin sensitivity by interleukin-4[J]. International Journal of Obesity, 2012, 36(7): 993-998.

[21] FENG Y，FENG Q，QU H M，et al. Stress adaptation is associated with insulin resistance in women with gestational diabetes mellitus[J]. Nutrition & Diabetes，2020，10(1)：4.

[22] MIAO M，WANG Q，WANG X Y，et al. The protective effects of inulin-type fructans against high-fat/sucrose diet-induced gestational diabetes mice in association with gut microbiota regulation[J]. Frontiers in Microbiology，2022，13：832151.

[23] CHEN Y H，OUYANG Y Z，CHEN X J，et al. Hypoglycaemic and anti-ageing activities of green alga *Ulva lactuca* polysaccharide *via* gut microbiota in ageing-associated diabetic mice[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2022，212：97-110.

[24] LI H J，LI C D. Causal relationship between gut microbiota and type 2 diabetes：a two-sample Mendelian randomization study[J]. Frontiers in Microbiology，2023，14：1184734.

[25] ZHAO Q Y，LIU Z Y，ZHU Y Q，et al. Cooked adzuki bean reduces high-fat diet-induced body weight gain，ameliorates inflammation，and modulates intestinal homeostasis in mice[J]. Frontiers in Nutrition，2022，9：918696.

[26] PENG M，WANG L M，SU H，et al. Ginsenoside Rg1 improved diabetes through regulating the intestinal microbiota in high-fat diet and streptozotocin-induced type 2 diabetes rats[J]. Journal of Food Biochemistry，2022，46(10)：e14321.

[27] CUI J R，RAMESH G，WU M，et al. Butyrate-producing bacteria and insulin homeostasis：the microbiome and insulin longitudinal evaluation study (MILES)[J]. Diabetes，2022，71(11)：2438-2446.

[28] ZANG Y Q，LIU J C，ZHAI A H，et al. Effects of highland barley *β*-glucan on blood glucose and gut microbiota in streptozotocin-induced，diabetic，C57BL/6 mice on a high-fat diet[J]. Nutrition，2023，107：111882.

[29] GE X D，LIU T T，CHEN Z，et al. *Fagopyrum tataricum* ethanol extract ameliorates symptoms of hyperglycemia by regulating gut microbiota in type 2 diabetes mellitus mice[J]. Food & Function，2023，14(18)：8487-8503.

[30] SUN Y，KANG K，LI Y L，et al. Tea polyphenols protect mice from acute ethanol-Induced liver injury by modulating the gut microbiota and short-chain fatty acids[J]. Journal of Functional Foods，2021，87：104865.

[31] HE S，PENG W B，ZHOU H L，et al. A combination of deep-sea water and fucoidan alleviates T2DM through modulation of gut microbiota and metabolic pathways[J]. Pharmaceuticals，2023，16(3)：462.

[32] PRIYADARSHINI M，NAVARRO G，REIMAN D J，et al. Gestational insulin resistance is mediated by the gut microbiome-indoleamine 2，3-dioxygenase axis[J]. Gastroenterology，2022，162(6)：1675-1689.

（责任编辑：史润东东）