

核桃酱对肾阳虚小鼠及其肠道微生物的作用

王利平 赵声兰 杨瑞 陈燕玲 王晓艳

(云南中医药大学, 云南 昆明 650500)

摘要: [目的] 探究核桃酱对肾阳虚及其肠道微生物的作用。[方法] 使用氢化可的松[25 mg/(kg·d)]构建肾阳虚小鼠模型, 试验随机分为正常组、模型组、阳性组, 以及核桃酱低、中、高剂量组, 连续灌胃核桃酱干预 14 d, 分析小鼠体重、自主活动能力和脏器指数变化, 检测血清环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)、肾上腺酮(CORT)、睾酮(T)和雌二醇(E2), HE 染色检测肾脏、睾丸、脾脏病理状况, 并分析肠道菌群组成。[结果] 与模型组相比, 核桃酱可使小鼠体重接近正常, 减小脏器指数的变化, 增加活动能力, 显著提高肾阳虚小鼠血清 cAMP、T 和 CORT 水平($P<0.05$), 显著降低血清 cGMP 和 E2 水平($P<0.05$), 缓减肾脏、睾丸及脾脏组织的病变程度。16S rDNA 测序显示核桃酱可以缓解肾阳虚小鼠肠道菌群丰富度和多样性的下降, 显著提高小鼠肠道拟杆菌门、绒毛杆菌属和乳杆菌属的相对丰度($P<0.05$), 显著降低厚壁菌门、放线菌门和葡萄球菌的相对丰度($P<0.05$)。[结论] 核桃酱可显著改善肾阳虚及其肠道菌群的多样性和组成。

关键词: 核桃酱; 肾阳虚; 肠道微生物; 16S rDNA 测序; 小鼠

Effects of walnut paste on kidney-yang deficiency mice and their gut microbiota

WANG Liping ZHAO Shenglan YANG Rui CHEN Yanling WANG Xiaoyan

(Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming, Yunnan 650500, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effects of walnut paste on kidney-yang deficiency and the gut microbiota. [Methods] Using hydrocortisone [25 mg/(kg·d)] to establish a kidney-yang deficiency mouse model, the experiment is randomly divided into a normal group, a model group, a positive control group, and low-, medium-, and high-dose walnut paste groups. The mice are continuously administered walnut paste via gavage for 14 days. Changes in body weight, autonomous activity, and organ indices are analyzed. Serum levels of cyclic adenosine monophosphate (cAMP), cyclic guanosine monophosphate (cGMP), corticosterone (CORT), testosterone (T), and estradiol (E2) are measured. Pathological conditions of the kidney, testis, and spleen are examined using HE staining, and the composition of the gut microbiota is analyzed. [Results] Compared to the model group, walnut paste restores the body weight of mice to near-normal levels, mitigates changes in organ indices, and increases autonomous activity. It significantly elevates serum levels of cAMP, T, and CORT in kidney-yang deficiency mice ($P<0.05$) and markedly reduces serum levels of cGMP and E2 ($P<0.05$). Additionally, walnut paste alleviates pathological damage in the kidney, testis, and spleen tissues. 16S rDNA sequencing reveals that walnut paste counteracts the reduction in gut microbiota richness and diversity in kidney-yang deficiency mice. It significantly increases the relative abundance of Bacteroidetes, Lachnospira, and Lactobacillus ($P<0.05$) and significantly decreases that of Firmicutes, Actinobacteria, and Staphylococcus ($P<0.05$). [Conclusion] Walnut paste has beneficial effects on kidney-yang deficiency and on the diversity and composition of the gut microbiota.

Keywords: walnut paste; kidney-yang deficiency; gut microbiota; 16S rDNA sequencing; mice

基金项目: 云南省重大科技专项(编号:202402AE090011); 云南省永平县核桃产业科技特派(编号:202204BI090014)

通信作者: 赵声兰(1962—), 女, 云南中医药大学教授, 硕士。E-mail: 13330431529@163.com

收稿日期: 2025-01-14 改回日期: 2025-09-11

引用格式: 王利平, 赵声兰, 杨瑞, 等. 核桃酱对肾阳虚小鼠及其肠道微生物的作用[J]. 食品与机械, 2025, 41(12): 123-132.

Citation: WANG Liping, ZHAO Shenglan, YANG Rui, et al. Effects of walnut paste on kidney-yang deficiency mice and their gut microbiota[J]. Food & Machinery, 2025, 41(12): 123-132.

肾阳虚为体内阳不制阴产生的一系列虚寒症状的病理状态^[1]。临床主要表现为面色发白、腰膝酸软、畏寒肢冷、精神萎靡、舌淡、性功能衰退等^[2]。现代研究^[3-5]发现,肾阳虚症会导致体重减轻、饮食减少、精神萎靡、活动能力减弱、机体免疫功能下降、能量代谢减弱、激素水平异常。随着不良饮食及生活习惯的改变,工作和精神压力的加大,越来越多人群出现肾阳虚,尤其是男性发病率高,严重影响了人们的生活质量及生育水平^[6]。近年来,越来越多的研究表明,肠道微生物失衡与慢性病密切相关,而饮食对其有较大影响。

核桃仁富含脂肪、蛋白质、膳食纤维等功能营养素^[7-8],具有抗菌、抗炎症因子、抗衰老、健脑益智、美容、补肾壮阳等作用^[9-10]。核桃及其提取物对调节肠道、改善便秘、缓解肾功能方面具有积极作用。张亭等^[11]研究发现,核桃低聚肽可促进小鼠血清中胃肠激素内毒素、胃动力表达,改善便秘,调节机体肠道健康。关丽等^[12]研究发现,核桃隔膜提取物能增强肾阳虚小鼠的睾丸激素分泌能力及肾功能。此外,核桃的摄入可以改变肠道微生物的组成和功能,进而可能影响宿主的健康。

目前,关于核桃酱改善肾阳虚及调节肠道微生物的研究较少。试验拟从核桃仁药食同源的角度切入,探讨核桃酱对肾阳虚小鼠的改善作用及对肠道微生物的调节。通过观察小鼠体重、脏器指数、行为学、血清生化指标、病理组织学变化的影响及对肠道微生物群落多样性的影响,以期揭示核桃酱在改善肾阳虚和调节肠道微生物方面的潜在作用,为开发新型核桃功能性食品提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料与试剂

核桃仁:云南其众食品有限公司;

生理盐水:山东齐都药业有限公司;

氯化可的松注射液:山西兆益生物有限公司;

金匮肾气丸:北京同仁堂科技发展股份有限公司;

环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)、肾上腺酮(CORT)、睾酮(T)和雌二醇(E2)酶免试剂盒:江苏酶联免疫实业有限公司。

1.1.2 仪器与设备

电子分析天平:FA214型,奥豪斯仪器有限公司;

多功能酶标仪:INFINITEM200PRO型,瑞士TECAN公司;

冷冻离心机:H1850-R型,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;

真空浓缩仪:5305型,德国Eppendorf公司;

组织包埋机:BMJ-A型,常州郊区中威电子仪器厂;

自动脱水机:JT-12S型,武汉俊杰电子有限公司;

干燥箱:WK-200B型,上海博讯医疗生物仪器股份有限公司。

1.1.3 试验动物

雄性昆明种小鼠:60只健康清洁级,初始体重为(20±2)g,饲养于云南中医药大学动物房,许可证号SCXK(湘)2019-0004,喂养期间给予小鼠普通维持饲料,自由饮水,室温(22±2)℃,相对湿度为(65±5)%,湖南斯莱克景达实验动物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 核桃酱制备 脱壳皮核桃仁80℃烘烤1h,冷却至室温,研磨,加入木糖醇($m_{\text{核桃仁}}:m_{\text{木糖醇}}=25:1$),充分混匀后装罐,密封贮藏,备用。

1.2.2 肾阳虚动物模型的构建、分组及给药 将60只昆明种健康小鼠随机抽取10只为正常组(Control),其余50只为造模组,造模组灌胃25 mg/(kg·d)的氯化可的松注射液,正常组灌胃10 mL/kg的生理盐水,连续14 d,以构建肾阳虚小鼠模型^[5,13-14]。将建模成功的肾阳虚模型小鼠随机分为模型组(Model)、阳性药组[PD,金匮肾气丸,1.2 g/(kg·d)]、核桃酱低[WS-L,1.67 g/(kg·d)]、中[WS-M,3.33 g/(kg·d)]、高[WS-H,6.67 g/(kg·d)]剂量组,每组10只,灌胃核桃酱干预14 d,Control、Model组灌胃等体积生理盐水。

核桃酱剂量确定依据:参考文献[15]并修改。核桃仁成人每日40 g/60 kg,人的标准体重为60 kg,小鼠标准体重为20 g,折算系数为9.1,且根据《保健食品功能检验与评价方法》,小鼠剂量为人体推荐剂量的10倍。试验剂量分别设计为核桃酱人体推荐剂量的2.5,5.0,10.0倍,即每日1.67,3.33,6.67 g/kg为核桃酱的低、中、高剂量。

1.2.3 小鼠体重变化 从第1天起每隔7 d称一次小鼠体重,共28 d,并记录各组小鼠的体重变化情况。

1.2.4 小鼠脏器指数 解剖前称小鼠体重,解剖后立刻分离胸腺、肾脏、脾脏、睾丸组织,脏器用生理盐水清洗3次,并用滤纸吸取表面残余水分,记录脏器质量,以脏器的质量与体重比值为脏器指数。

1.2.5 旷场试验 试验第28天进行旷场试验,记录小鼠在4 min内的穿越格数(1/2身体跨过该格子)和站立次数(两前肢离开地面即可)。

1.2.6 血清指标检测 采集血液样本后,室温静置6 h,离心取上清液,将血清转移到干净的1 mL离心管中,用封口膜密封并于-80℃贮藏保存。按照试剂盒说明书检测血清cAMP、cGMP、CORT、T、E2。

1.2.7 组织病理学分析 解剖取出的肾脏、脾脏、睾丸,用10%的多聚甲醛固定,制备石蜡切片,HE染色,在光镜下观察肾脏、脾脏、睾丸的病理组织变化。参考文献[16]的方法进行组织病理学评分,对应的相对病变程度描述和评分标准见表1。

1.2.8 肠道微生物检测 用CATB法从小鼠肠道内容物

表 1 四级病变法组织病理学评分

Table 1 Histopathology scores for the four-level lesion method

评分	等级	病变程度	分级的定义
0	-	正常范围	在试验条件下,结合年龄、性别和种系等因素考虑,可能有改变出现,但在其他情况下可能会考虑为正常状态的偏离
1	+	轻微	出现的变化几乎不超过正常范围内的变化(即最低限度的变化)
2	++	轻度	病变易于识别,但严重程度有限;病变可能不会产生任何功能障碍;病变组织范围占受检组织的11%~20%
3	+++	中度	病变突出,很有可能向严重性发展的趋向;可能产生有限度的组织或器官功能障碍;21%~40%的组织受累
4	++++	重度	病变程度严重且已形成完全性病变,预期会产生明显的组织或器官功能障碍;病变涉及41%~100%的受检组织范围

样本中提取总DNA,1.2%琼脂糖凝胶电泳对DNA进行质检,使用引物338F(5ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3)-806R(GGACTACHVGGGTWTCTAAT)进行PCR扩增,采用Illumina平台对小鼠肠道内容物菌群样本进行双端(Paired-end)测序,根据ASV/OTU^[17]在不同样本中的分布,评估每个样本的多样性水平。在物种分类学组成层面,分析不同组间的物种丰度的差异组成。

1.3 数据处理

使用Excel 2020软件进行数据整理,GraphPad Prism 9.4.1软件进行统计学分析与绘图。试验结果表示为均数±标准差,每组间采用单因素方差进行分析比较, $P<0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 对小鼠体重的影响

由图1可知,造模期间,Control组小鼠体重明显上升,造模组小鼠体重有一定程度的降低。第14天给予WS后,小鼠体重均有所增长,WS高、中、低剂量组小鼠体重介于Control组和Model组之间。试验第28天,与Control组相比,Model组小鼠体重降低了12.31%($P<0.0001$)。与Model组相比,PD组和WS-L、WS-M组小鼠体重分别升高了8.54%,7.59%,6.40%($P<0.01$, $P<0.05$, $P<0.05$),说明肾阳虚小鼠体重会减轻,与Du等^[5]的研究结果一致。表明WS可以使肾阳虚小鼠的体重接近正常水平,消瘦状态得到改善。

2.2 对小鼠脏器指数的影响

胸腺指数和脾脏指数与机体免疫系统有关系,肾阳虚会破坏机体的免疫功能,使胸腺指数和脾脏指数减小;肾脏作为排泄器官,其指数减小表明排泄功能下降;睾丸作为雄性哺乳动物生殖器官,其指数下降表明性功能下降衰弱。由表2可知,与Control组相比,Model组小鼠睾丸、肾脏、脾脏、胸腺等脏器指数显著降低($P<0.01$, $P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.05$)。与Model组相比,PD组的睾丸指数、脾脏指数显著升高($P<0.05$),WS-M组睾丸指数显著升高($P<0.05$),WS-H组脾脏指数显著升高($P<0.05$),

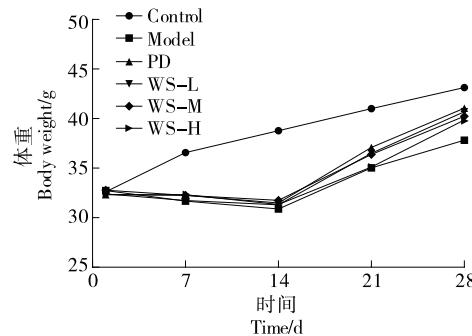


图1 小鼠体重变化

Figure 1 Changes in body weight of mice

表2 核桃酱对小鼠脏器指数的影响[†]

Table 2 Effects of walnut paste on organ indices in mice

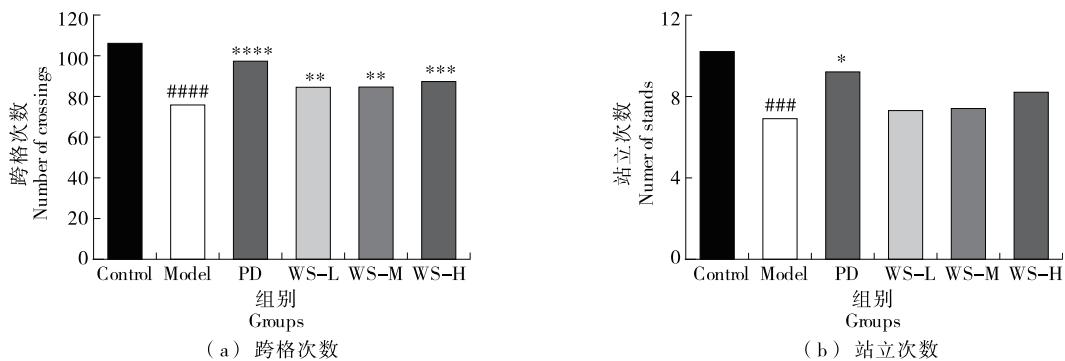
组别	睾丸	肾脏	脾脏	胸腺
Control	7.25±0.91	14.5±1.12	4.15±0.66	2.33±0.30
Model	6.09±0.72 [#]	13.01±1.25 [#]	3.04±0.69 [#]	1.82±0.32 [#]
PD	7.02±0.69 [*]	13.88±0.86	4.09±0.79 [*]	2.24±0.41
WS-L	6.38±0.72	13.29±1.03	3.05±0.69	2.05±0.33
WS-M	7.04±0.77 [*]	13.20±1.55	3.21±0.72	2.18±0.72
WS-H	6.75±1.14	13.02±1.00	3.65±1.07 [*]	2.01±0.52

[†] 与Control组相比,[#]为 $P<0.05$,^{##}为 $P<0.01$;与Model组相比,*为 $P<0.05$ 。

表明WS能逆转肾阳虚小鼠脏器指数的变化。

2.3 对小鼠自主活动的影响

肾阳虚会使小鼠出现精神萎靡、活动减少、腰膝酸软,身体虚弱等现象。由图2可知,与Control组相比,Model组小鼠在旷场中的跨格次数和站立次数分别减少了39.32%,47.14%($P<0.0001$, $P<0.001$);与Model组相比,PD组跨格次数和站立次数分别增加了28.02%,32.86%($P<0.0001$, $P<0.05$),WS-L、WS-M、WS-H组跨格次数分别增加了11.20%,11.33%,14.84%($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.001$),与Du等^[5]的研究结果一致。表明WS能



与 Control 组相比,#### 为 $P<0.0001$,### 为 $P<0.001$;与 Model 组相比,*** 为 $P<0.001$,** 为 $P<0.01$,* 为 $P<0.05$

图 2 跨格次数和站立次数

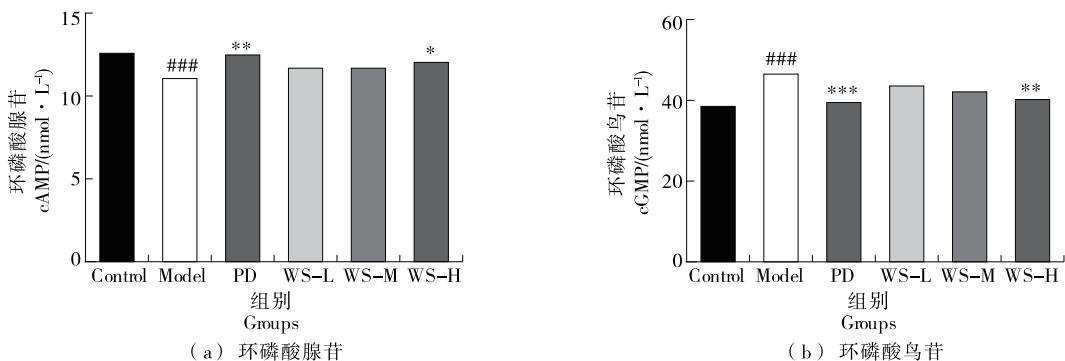
Figure 2 Number of hurdles and number of stands

有效改善肾阳虚模型小鼠的精神状态和自主活动能力。

2.4 对小鼠血清 cAMP 和 cGMP 的影响

能量代谢与肾阳虚密切相关,cAMP 和 cGMP 是检测交感—肾上腺功能的相关指标之一,血清 cAMP 降低,说明机体处于一种阳虚状态^[18]。由图 3 可知,与 Control 组相比,Model 组小鼠血清 cAMP 水平降低了 13.70% ($P<$

0.001),cGMP 水平升高了 20.55% ($P<0.001$),与 Zeng 等^[19]的研究结果一致。与 Model 组相比,PD 组和 WS-H 组血清 cAMP 水平分别升高了 12.80%,8.77% ($P<0.01,P<0.05$)。与 Model 组相比,PD 组和 WS-H 组血清 cGMP 水平分别降低了 17.67%,15.49% ($P<0.001,P<0.01$)。表明 WS 可有效逆转肾阳虚小鼠血清 cAMP 和 cGMP 水平。



与 Control 组相比,### 为 $P<0.001$;与 Model 组相比,*** 为 $P<0.001$,** 为 $P<0.01$,* 为 $P<0.05$

图 3 核桃酱对小鼠血清 cAMP 和 cGMP 的影响

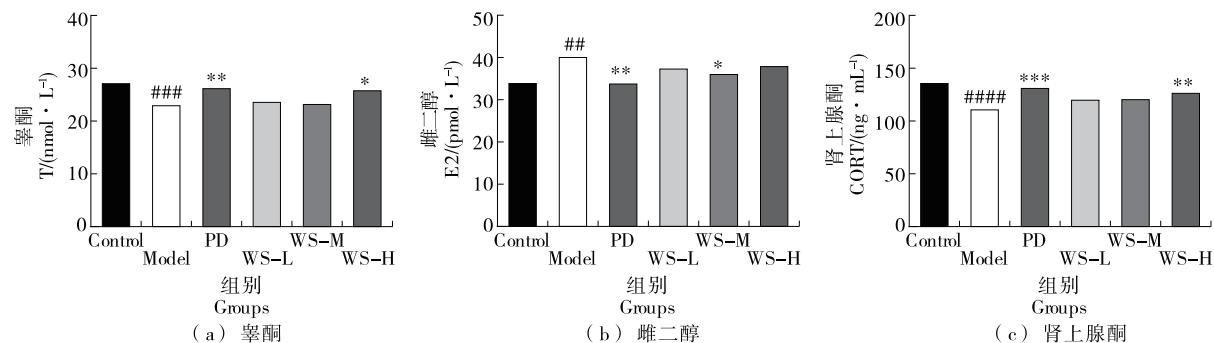
Figure 3 Effects of walnut paste on serum cAMP and cGMP in mice

2.5 对小鼠血清 T、E2、CORT 的影响

研究^[20]表明,肾阳虚会造成下丘脑—垂体—肾上腺轴功能紊乱,并累及性腺轴和甲状腺轴,CORT 降低、T 降低和 E2 激素升高是肾阳虚的重要指标。由图 4 可知,与 Control 组相比,Model 组血清 T 和 CORT 含量分别降低了 17.82%,22.25% ($P<0.001,P<0.0001$),血清 E2 含量升高了 18.00% ($P<0.01$),肾阳虚建模成功。与 Model 组相比,PD 组血清 T 和 CORT 含量分别升高了 13.90%,18.16% ($P<0.01,P<0.001$),E2 含量降低了 18.45% ($P<0.01$),WS-H 组血清 T 升高了 12.18% ($P<0.05$),CORT 升高了 14.00% ($P<0.01$),WS-M 组血清 E2 含量降低了 11.08% ($P<0.05$)。表明 WS 对肾阳虚小鼠的激素水平有明显的恢复作用。

2.6 对小鼠肾脏、睾丸、脾脏组织病理的影响

由图 5 和图 6 可知,Control 组小鼠肾小球、肾小管形态保持完整,未见外观改变,皮质、髓质结构无异常改变,系膜细胞增生正常,未见明显扩张管型等变性,肾小管上皮细胞未见疏松水肿和脱落。与 Control 组相比,Model 组小鼠肾脏组织结构出现异常,肾囊壁层上皮细胞肿胀,肾小球内皮细胞数量减少,系膜细胞增生病变增多,肾小管上皮细胞变性充血,组织病变评分显著升高 ($P<0.0001$)。与 Model 组相比,PD 组小鼠肾脏组织结构基本正常,肾小球未见明显萎缩硬化坏死等变性,肾小管上皮细胞未见疏松水肿脱落,组织病变评分显著降低 ($P<0.001$)。其他 WS 组小鼠肾脏组织相比 Model 组均有一定改善,肾脏组织病变评分显示,与 Model 组相比 WS-M、WS-H 的



与 Control 组相比,#### 为 $P < 0.0001$, *** 为 $P < 0.001$, # 为 $P < 0.01$; 与 Model 组相比, *** 为 $P < 0.001$, ** 为 $P < 0.01$, * 为 $P < 0.05$

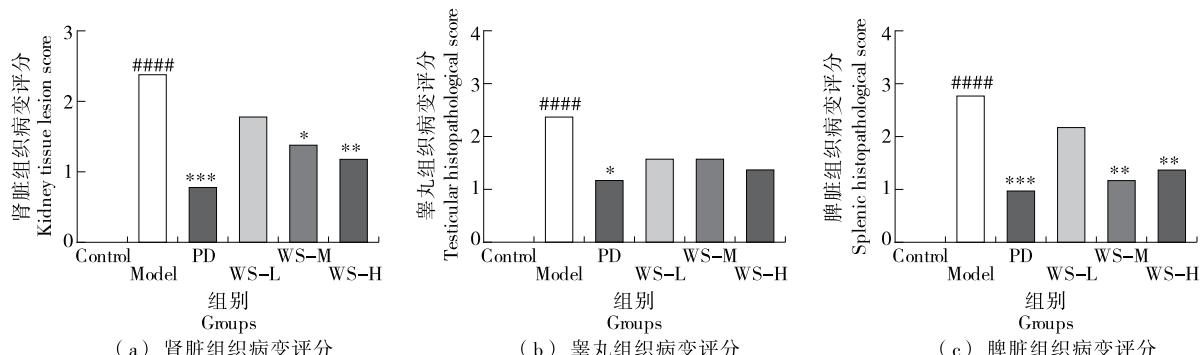
图 4 核桃酱对小鼠血清 T、E2、CORT 的影响

Figure 4 Effects of walnut paste on serum T, E2, and CORT in mice

病变组织评分明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 说明 WS 能够改善肾阳虚小鼠的肾脏组织损伤。

由图 5 和图 7 可知, Control 组小鼠睾丸生精小管基膜完整且厚, 间质细胞分布均匀, 结缔组织形态正常。生精细胞及其支持细胞在基膜内呈均匀分布的正常状态, 精

子在生精小管管腔内清晰可见, 且数量较多。与 Control 组相比, Model 组小鼠睾丸的生精小管内的生精细胞排布杂乱, 细胞圈层稀疏且基膜变薄, 生精小管内间质出现较大的空隙, 间质细胞数量有一定减少, 睾丸组织病变评分显著升高 ($P < 0.0001$)。与 Model 组相比, PD 组小鼠睾丸



与 Control 组相比,#### 为 $P < 0.0001$; 与 Model 组相比, *** 为 $P < 0.001$, ** 为 $P < 0.01$, * 为 $P < 0.05$

图 5 核桃酱对小鼠肾脏、睾丸、脾脏组织病变评分的影响

Figure 5 Effects of walnut paste on tissue lesion scores of kidney, testis, and spleen in mice

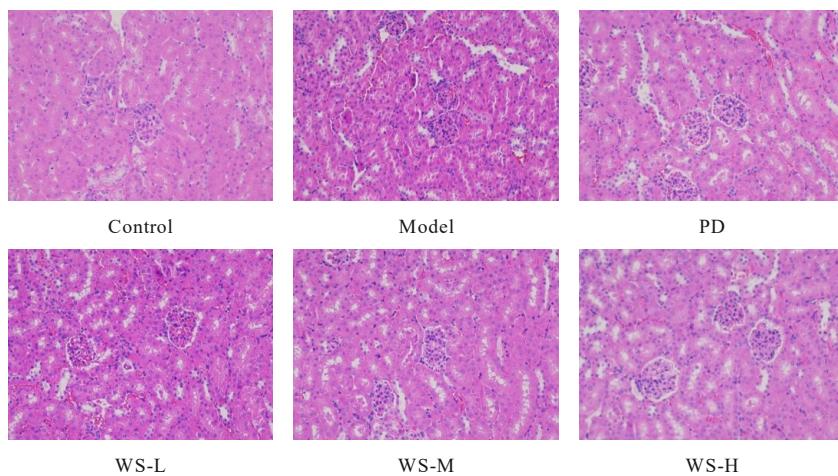


图 6 核桃酱对小鼠肾脏组织形态的影响

Figure 6 Effects of walnut paste on the histomorphology of mouse kidney (100×)

组织结构基本正常,未见严重结构改变,且组织病变评分显著升高($P<0.05$)。WS 各组睾丸组织相比 Model 组均有一定程度的改善。

由图 5 和图 8 可知,Control 组小鼠脾脏未见萎缩现象,白髓分布较多,红髓分布较广,脾脏结构完整。与 Control 组相比,Model 组小鼠脾脏出现萎缩现象,白髓成分减少,红髓分布减少,脾脏组织病变评分显著升高($P<$

0.000 1)。与 Model 组相比,PD 组小鼠脾脏组织结构接近正常,没有严重结构改变,组织病变评分显著降低($P<0.001$)。从脾脏组织病变评分看,WS 各组的病变程度介于 Control 组和 Model 组之间,其中 WS-M、WS-H 组的组织病变评分显著降低($P<0.01$),且红髓成分增加较为明显,能够增强脾脏免疫和造血功能,显著改善造模后的免疫抑制状态。

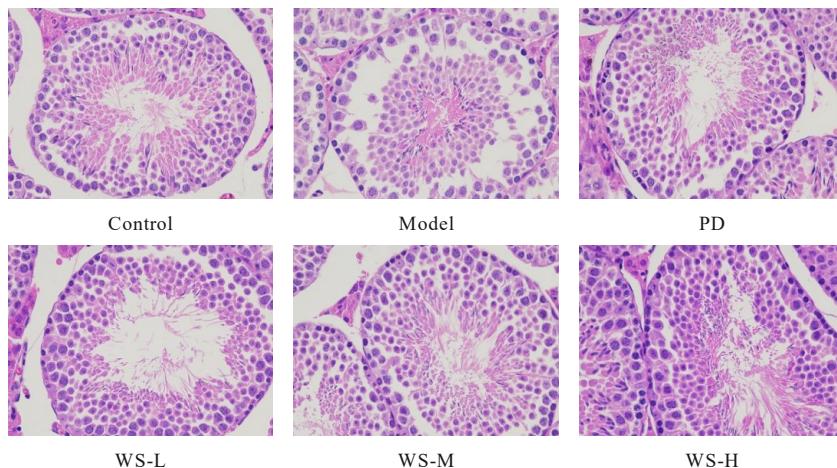


图 7 核桃酱对小鼠睾丸组织形态的影响

Figure 7 Effect of walnut paste on the histomorphology of mouse testis (50 \times)

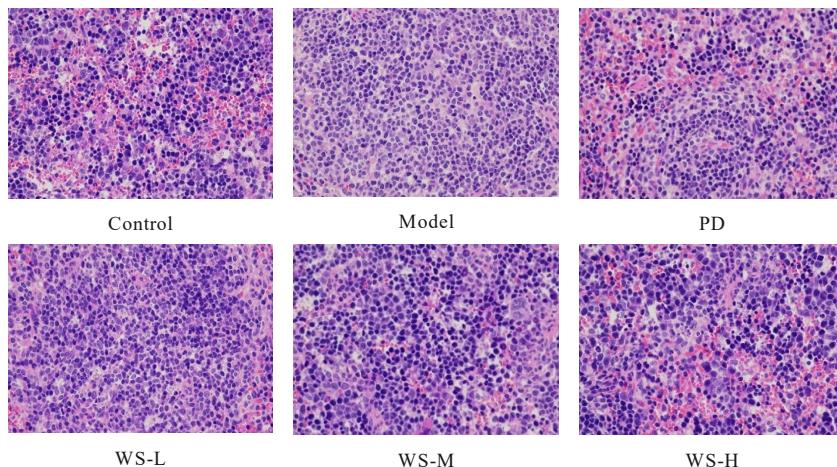


图 8 核桃酱对小鼠脾脏组织形态的影响

Figure 8 Effect of walnut paste on the histomorphology of mouse spleen (50 \times)

2.7 对小鼠肠道微生物的影响

2.7.1 物种稀释曲线 由图 9 可知,随着测序数量的增加,每组曲线趋于平坦,表明测序结果有效且合理。当群落多样性趋于稳定后,Model 组微生物多样性低于 Control 组,测序结果可以反映样本物种的丰富性和多样性。

2.7.2 肠道微生物 Alpha 多样性 肠道的内表面是结构复杂的黏膜免疫系统,同时也是人体最大的免疫器官。肠道菌群紊乱可能导致全身免疫和中枢免疫异常,进而

引发炎症反应^[21]。有研究^[22]表明,肾阳虚导致了肠道菌群的失调,降低了肠道微生物的多样性,机体消化功能异常。Alpha 多样性是衡量生态系统或特定区域内生物多样性的指标^[23],主要包括物种丰度、物种均匀度和多样性等评估标准,通常运用 Ace 和 Chao 等指数衡量群落的丰度,Shannon 等指数反映群落多样性,Coverage 指数用于描述群落的覆盖程度。由表 3 可知,与 Control 组相比,Model 组 Ace 指数和 Chao 指数降低,Shannon 指数显著降

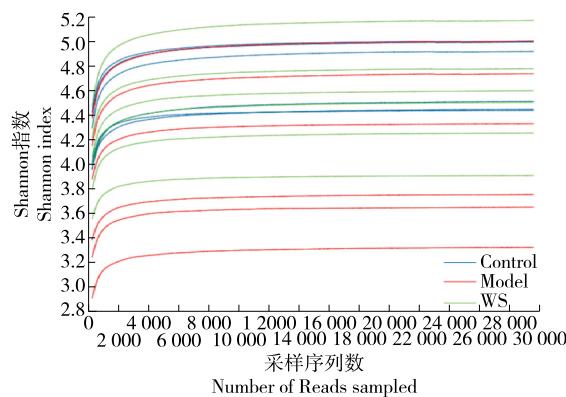


图9 物种稀释曲线

Figure 9 Species dilution curves

低($P<0.05$)。与Model组相比,WS组Ace指数和Chao指数升高,Shannon指数显著升高($P<0.05$)。而WS干预后逆转了小鼠肠道微生物,使肠道微生物的多样性显著增加,此外,各组小鼠肠道微生物覆盖度指数Coverage指数均 >0.99 ,表明测序结果可代表样本中微生物群落的真实情况。

2.7.3 肠道微生物 Beta 多样性 由图 10 可知,Control 组与 Model 组微生物群距离较远,无重合的区域,两组间微生物组成存在明显差异,表明 Model 组肠道菌群显著区别于 Control 组,肾阳虚使肠道菌群紊乱。WS 组与 Model 组相对分离,重合面积较少,较为接近 Control 组,表明 WS 可以帮助肠道微生物失调的肾阳虚小鼠恢复至正常的肠道菌群结构。

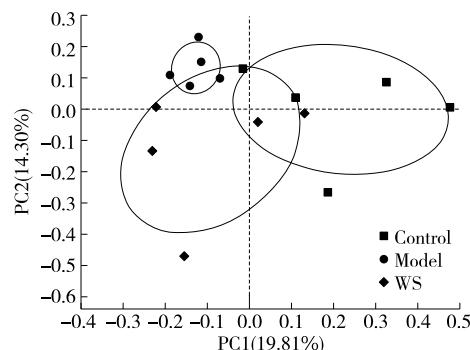


图10 Beta 多样性分析

Figure 10 Beta diversity analysis

2.7.4 门水平肠道微生物组成结构 由图 11 可知,在门水平上,小鼠肠道微生物主要包括拟杆菌门(*Bacteroidota*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、髌骨菌门(*Patescibacteria*)、弯曲菌门(*Campylobacterota*)和放线菌门(*Actinobacteriota*),其中,拟杆菌门和厚壁菌门是肾阳虚小鼠肠道菌群内相对丰度最高的两大门,Control 组拟杆菌门的相对丰度接近 65%,厚壁菌门的相对丰度为 25% 左右;Model 组厚壁菌门、放线菌门菌群相对丰度显著增加,拟杆菌门、髌骨菌门相对丰度极大降低;WS 组拟杆菌门、厚壁菌门、髌骨菌门均有不同程度的变化。厚壁菌门和拟杆菌门的失衡主要与能量代谢有关,肾阳虚症的发生与能量代谢紊乱密切相关。与 Control 组相比,Model 组小鼠肠道 *Firmicutes/Bacteroidetes* 比值显著升高($P<0.001$);与 Model 组相比,WS 组小鼠肠道 *Firmicutes/Bacteroidetes* 比值显著降低($P<0.01$)。*Firmicutes/Bacteroidetes* 比值通常用来评价肠道健康状况的重要指标^[24]。当 *Firmicutes/Bacteroidetes* 比值失调时,会引起炎症、自身免疫疾病和癌症等多种疾病^[25]。Model 组厚壁菌门丰度上升可能因为具有耐药性菌群,在灌胃氯化可的松之后存活并大量增殖,其被认为与多种疾病有关^[26];拟杆菌是临床最重要有益的革兰氏阴性菌,可以抑制致病菌群的生长和分解有害物质,分解膳食碳水化合物,激活免疫系统,拟杆菌主要参与类固醇代谢和碳水化合物代谢,其水平在肾阳虚模型中明显低^[6],与试验结果一致;放线菌是炎症相关疾病的潜在治疗靶点。综上,补充 WS 可以一定程度恢复肠道微生物的丰度和多样性。

2.7.5 科水平肠道微生物组成结构 由图 12 可知,在科水平上,优势菌属主要有绒毛杆菌属(*Muribaculaceae*)、文肯菌属(*Rikenellaceae*)、葡萄球菌属(*Staphylococcaceae*)、普雷沃菌属(*Prevotellaceae*)、毛螺菌属(*Lachnospiraceae*)和拟杆菌属(*Bacteroidaceae*)。与 Control 组相比,Model 组小鼠肠道葡萄球菌相对丰度显著升高($P<0.001$),与 Model 组相比,补充 WS 后葡萄球菌的相对丰度显著降低($P<0.01$);与 Control 组相比,Model 组小鼠肠道绒毛杆菌属($P<0.01$)、文肯菌属($P<0.05$)、普雷沃菌属($P<0.05$)、毛螺菌属($P<0.05$)、拟杆菌属($P<0.05$)的相对丰度显著降低,与 Model 组相比,补充 WS 后可以使这些菌属丰度增加。Model 组绒毛杆菌属、文肯菌属、毛螺菌属的相对丰度降低,其中绒毛杆菌属于拟杆菌门,主要存在

表3 Alpha 多样性指数[†]

Table 3 Alpha diversity index

组别	Ace 指数	Chao 指数	Shannon 指数	Coverage 指数
Control	835.29±156.15	825.97±155.79	4.71±0.25	0.9988±0.0002
Model	748.23±134.2	737.15±134.21	3.83±0.29 [#]	0.9984±0.0002
WS	776.32±143.17	770.58±149.37	4.54±0.32 [*]	0.9992±0.0002

[†] 与 Control 组相比,[#] 为 $P<0.05$; 与 Model 组相比,^{*} 为 $P<0.05$ 。

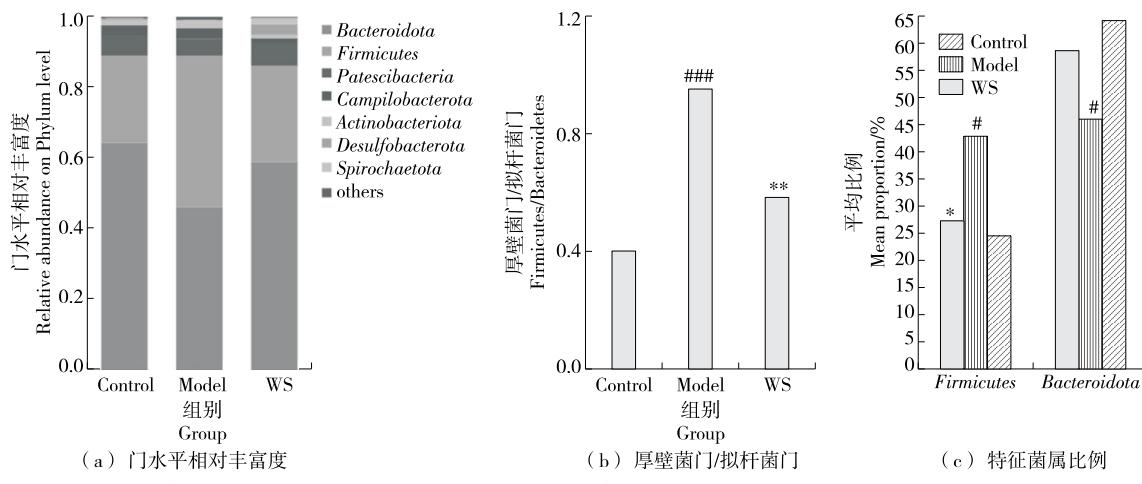


图 11 小鼠肠道微生物在门水平上的相对丰度

Figure 11 Relative abundance of mouse gut microbiota at the phylum level

于小鼠肠道内,且与肠道的健康和免疫有关,被认为能够影响宿主的免疫状态,可通过缓解下丘脑—垂体—肾上腺轴的激活状态和炎症水平,抑制色氨酸代谢^[27];葡萄球菌出现相对丰度升高,可能导致疾病的发生,葡萄球菌属于革兰氏阳性球菌,适应能力强,能够产生多种致病菌。补充 WS 后绒毛杆菌属相对丰度上升,葡萄球菌的相对丰度降低,肠道微生物失调得到改善。

2.7.6 属水平肠道微生物组成结构 由图 13 可知,在属水平上,小鼠肠道优势菌属主要有 *norank_f_Muribaculaceae*、葡萄球菌(*Staphylococcaceae*)、另枝菌属(*Alistipes*)。与 Control 组相比, Model 组小鼠肠道葡萄球菌相对丰度显著升高($P < 0.001$),与 Model 组相比,补充 WS 后丰度显著降低($P < 0.05$);与 Control 相比, Model 组小鼠

肠道 *norank_f_Muribaculaceae* ($P < 0.05$)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、拟杆菌属(*Bacteroides*) ($P < 0.05$)、*norank_f_norank_o_Clostridia_UCG-014*、普雷沃菌属(*Alloprevotella*) ($P < 0.05$) 的相对丰度显著降低,与 Model 组相比 5 种菌属的丰度显著增加。Model 组乳杆菌属的相对丰度降低,乳杆菌属对健康十分重要,能有效改善和维持肠道正常的微生物环境,抑制有害菌在肠上皮的黏附,还可以刺激免疫球蛋白的产生,强化人体免疫系统^[28]。综上,WS 可以有效恢复肾阳虚小鼠肠道微生物的丰度和多样性,改善肠道微生物的稳态,提高机体的免疫功能。

3 结论

通过氢化可的松诱导的肾阳虚小鼠模型,对核桃酱

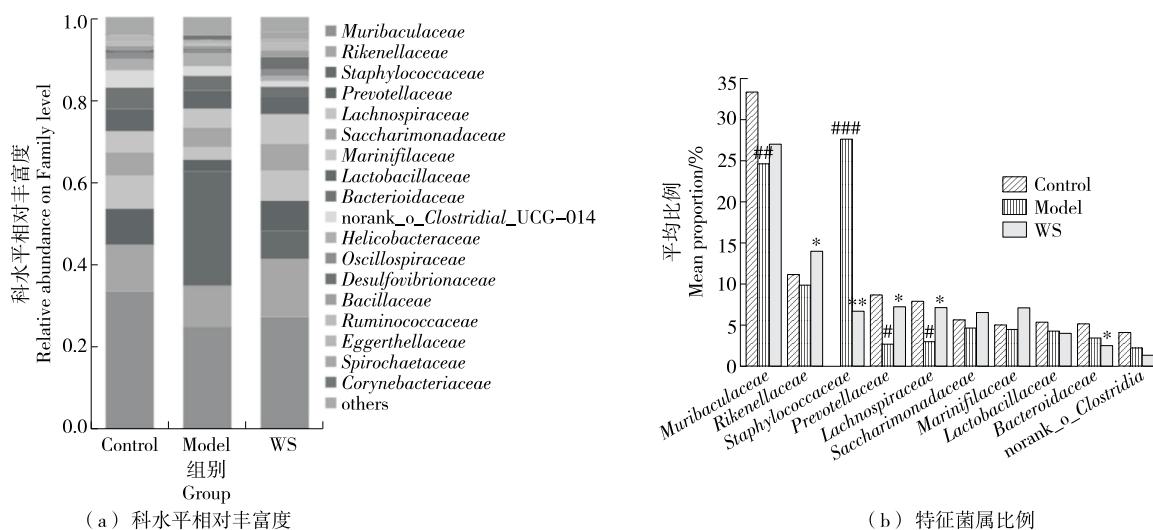


图 12 小鼠肠道微生物在科水平上的相对丰度

Figure 12 Relative abundance of mouse gut microbiota at the family level

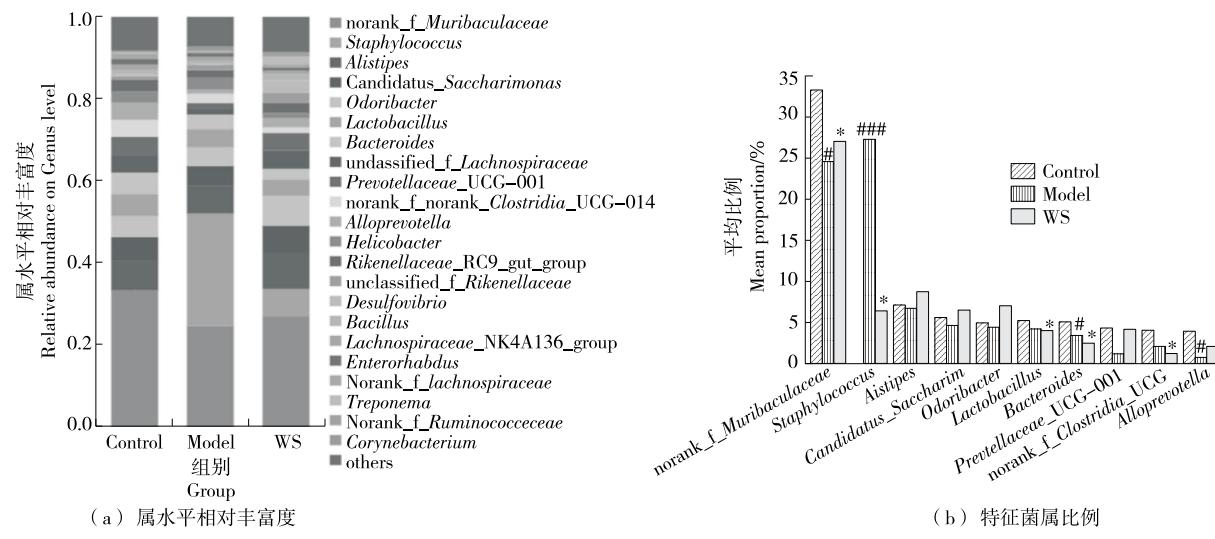
与 Control 组相比,### 为 $P < 0.001$, # 为 $P < 0.05$; 与 Model 组相比,* 为 $P < 0.05$

图 13 小鼠肠道微生物在属水平上的相对丰富度

Figure 13 Relative abundance of mouse gut microbiota at the genus level

改善肾阳虚小鼠的作用及肠道微生物的变化进行了分析。结果表明,模型组环磷酸腺苷、睾酮和肾上腺酮含量显著降低($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.0001$),环磷酸腺苷和雌二醇含量显著升高($P < 0.001$, $P < 0.01$),表明肾阳虚模型构建成功。给予核桃酱后可以显著升高环磷酸腺苷、睾酮和肾上腺酮含量,显著降低环磷酸鸟苷和雌二醇含量,增加小鼠自主活动能力,减缓小鼠肾脏、睾丸、脾脏组织病理状态,且可以显著改善肠道微生物中的有益菌属的相对丰度,降低有害菌属的相对丰度和种类。肠道微生物短链脂肪酸产生菌丰度增加,可以通过调节能量代谢、免疫反应和调节下丘脑—垂体—性腺轴改善肾阳虚症状;益生菌的增加可能通过改善能量代谢和营养吸收,促进体重恢复;抑制有害菌可以降低炎症因子水平,增强肾阳虚小鼠免疫功能,但其他作用通路和机制需进一步探讨。

参考文献

- [1] 武峻艳, 张俊龙, 王杰. 从人体“自组织”特性谈“肾藏精”[J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(6): 1191-1193.
- [2] CHEN L M, GUO X, WANG H, et al. Based on serum pharmacochemistry and metabolomics studied the pharmacodynamic material basis and mechanism of rubi fructus (Fupenzi) in improving the symptom of kidney-Yang deficiency [J]. Chemistry & Biodiversity, 2025, 22(2): e202400655.
- [3] 王祥山, 朱映黎, 吕美豫, 等. 鹿鞭对肾阴虚及肾阳虚小鼠抗疲劳作用及 PI3K-Akt 通路机制研究[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(11): 3032-3038.
- [4] 何丽君, 张增弟, 郑婉玉, 等. 淫羊藿苷对肾阳虚小鼠肾保护作用的研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(2): 236-240.
- [5] DU K, GAO X X, FENG Y, et al. Integrated adrenal and testicular metabolomics revealed the protective effects of Guilingji on the Kidney-Yang deficiency syndrome rats[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 255: 112734.
- [6] CHEN R Q, WANG J, ZHAN R H, et al. Fecal metabonomics combined with 16S rRNA gene sequencing to analyze the changes of gut microbiota in rats with kidney-Yang deficiency syndrome and the intervention effect of You-Gui pill[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2019, 244: 112139.
- [7] 杨月欣, 中国疾病预防控制中心营养与健康所. 中国食物成分表: 标准版[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2018: 84-87.
- [8] YANG Y X, Institute of Nutrition and Health, Chinese Center for Disease Control and Prevention. China's food composition table: standard version[M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2018: 84-87.
- [9] 何佳丽, 胡恩明, 王纪辉, 等. 核桃叶及其乙醇提取物化学成分分析[J]. 食品与机械, 2024, 40(6): 164-169.
- [10] HE J L, HU E M, WANG J H, et al. Chemical composition analysis of walnut leaves and their ethanol extracts[J]. Food & Machinery, 2024, 40(6): 164-169.
- [11] MCKAY D L, OLIVER CHEN C Y, YEUM K J, et al. Chronic and acute effects of walnuts on antioxidant capacity and nutritional status in humans: a randomized, cross-over pilot

Lubian on kidney Yin deficiency and kidney Yang deficiency mice and mechanism based on PI3K-Akt pathway[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2023, 48(11): 3 032-3 038.

[4] 何丽君, 张增弟, 郑婉玉, 等. 淫羊藿苷对肾阳虚小鼠肾保护作用的研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(2): 236-240.

HE L J, ZHANG Z D, ZHENG W Y, et al. Study on the protective effect of icariin on kidney of kidney-Yang deficiency mice[J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2023, 39(2): 236-240.

[5] DU K, GAO X X, FENG Y, et al. Integrated adrenal and testicular metabolomics revealed the protective effects of Guilingji on the Kidney-Yang deficiency syndrome rats[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 255: 112734.

[6] CHEN R Q, WANG J, ZHAN R H, et al. Fecal metabonomics combined with 16S rRNA gene sequencing to analyze the changes of gut microbiota in rats with kidney-Yang deficiency syndrome and the intervention effect of You-Gui pill[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2019, 244: 112139.

[7] 杨月欣, 中国疾病预防控制中心营养与健康所. 中国食物成分表: 标准版[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2018: 84-87.

YANG Y X, Institute of Nutrition and Health, Chinese Center for Disease Control and Prevention. China's food composition table: standard version[M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2018: 84-87.

[8] 何佳丽, 胡恩明, 王纪辉, 等. 核桃叶及其乙醇提取物化学成分分析[J]. 食品与机械, 2024, 40(6): 164-169.

HE J L, HU E M, WANG J H, et al. Chemical composition analysis of walnut leaves and their ethanol extracts[J]. Food & Machinery, 2024, 40(6): 164-169.

[9] MCKAY D L, OLIVER CHEN C Y, YEUM K J, et al. Chronic and acute effects of walnuts on antioxidant capacity and nutritional status in humans: a randomized, cross-over pilot

- study[J]. Nutrition Journal, 2010, 9: 21.
- [10] NI Z J, ZHANG Y G, CHEN S X, et al. Exploration of walnut components and their association with health effects[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62(19): 5 113-5 129.
- [11] 张亭, 珠娜, 刘睿, 等. 核桃低聚肽润肠通便功能作用[J]. 中国公共卫生, 2019, 35(9): 1 225-1 228.
ZHANG T, ZHU N, LIU R, et al. Effect of walnut oligopeptides on intestine-moistening and constipation-relieving in mice: an experimental research[J]. Chinese Journal of Public Health, 2019, 35(9): 1 225-1 228.
- [12] 美丽, 张淑兰, 王国军, 等. 核桃隔膜不同极性部位对肾阳虚小鼠的影响[J]. 兵团医学, 2013, 11(4): 41-44.
GUAN L, ZHANG S L, WANG G J, et al. Effects of different polar parts of walnut septum on mice with kidney Yang deficiency [J]. Journal of Bingtuan Medicine, 2013, 11(4): 41-44.
- [13] 李威, 王顺谱, 杨凤云. 肾阳虚证动物模型建立方法及评定标准研究进展[J]. 江西中医药, 2021, 52(8): 74-76.
LI W, WANG S P, YANG F Y. Research progress on establishment method and evaluation standard of animal model of kidney Yang deficiency syndrome[J]. Jiangxi Journal of Traditional Chinese Medicine, 2021, 52(8): 74-76.
- [14] DU W F, LV Y, WU H, et al. Research on the effect of Dipsaci Radix before and after salt-processed on kidney yang deficiency syndrome rats and the preliminary mechanism study through the BMP-Smad signaling pathway[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 312: 116480.
- [15] 王帅, 李汉洋, 戴涟漪, 等. 核桃改善小鼠睡眠功能及其作用机制研究[J]. 营养学报, 2017, 39(2): 189-193.
WANG S, LI H Y, DAI L Y, et al. Effects of walnuts on sleep improvement in mice and its mechanism[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2017, 39(2): 189-193.
- [16] MANN P C. 大鼠和小鼠病理变化术语及诊断标准的国际规范(INHAND)[M]. 杨利峰, 周向梅, 赵德明, 译. 北京: 中国农业出版社, 2019: 5-6.
MANN P C. International norms for terminology and diagnostic criteria for pathological changes in rats and mice (INHAND) [M]. YANG L F, ZHOU X M, ZHAO D M. Beijing: China Agriculture Press, 2019: 5-6.
- [17] KEMP P F, ALLER J Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 47(2): 161-177.
- [18] 李家晴. 炖巴戟天炮制工艺及其补肾阳作用的研究[D]. 南昌: 江西中医药大学, 2022: 51-55.
LI J Q. Study on processing technology of morinda officinalis and its effect of tonifying kidney yang[D]. Nanchang: Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, 2022: 51-55.
- [19] ZENG Y J, LI T N, ZHANG X R, et al. Effects of Haima Duobian pill in a rat model of kidney Yang deficiency syndrome[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2021, 2 021(1): 6696234.
- [20] 唐维我, 张会永, 李芹, 等. 肾阳虚证动物模型造模方法及模型评价[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2021, 23(4): 1 317-1 324.
TANG W W, ZHANG H Y, LI Q, et al. Modeling methods and model evaluation of animal models for kidney Yang deficiency syndrome[J]. Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology, 2021, 23 (4): 1 317-1 324.
- [21] DOU P, ZHUANG Z H, ZHAO Y M, et al. Effects of three medical nutrition therapies on nutritional metabolism and intestinal flora in overweight/obese with polycystic ovary syndrome (PCOS): study protocol for a randomised controlled trial[J]. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 2023, 32(1): 33-39.
- [22] GE W, ZHOU B G, ZHONG Y B, et al. Sishen pill ameliorates dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis with spleen-kidney Yang deficiency syndromes: role of gut microbiota, fecal metabolites, inflammatory dendritic cells, and TLR4/NF- κ B pathway[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2022, 2 022: 6132289.
- [23] PEÑA-OCAÑA B A, SILVA-FLORES M, SHOTARO T, et al. Transplant of gut microbiota ameliorates metabolic and heart disorders in rats fed with a hypercaloric diet by modulating microbial metabolism and diversity[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2024, 181: 117667.
- [24] KAPOOR P, TIWARI A, SHARMA S, et al. Effect of anthocyanins on gut health markers, Firmicutes-Bacteroidetes ratio and short-chain fatty acids: a systematic review via meta-analysis[J]. Scientific Reports, 2023, 13(1): 1 729.
- [25] AN J, KWON H, KIM Y J. The firmicutes/bacteroidetes ratio as a risk factor of breast cancer[J]. Journal of Clinical Medicine, 2023, 12(6): 2 216.
- [26] 莫秋芬. 月桂酸单甘油酯对 DSS 诱导的小鼠结肠炎的改善作用及其机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2020: 4-6.
MO Q F. Study on the ameliorative effect and mechanism of glycerol monolaurate on DSS-induced colitis in mice[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2020: 4-6.
- [27] ZHONG X Q, ZHAO Y C, HUANG L, et al. Remodeling of the gut microbiome by *Lactobacillus johnsonii* alleviates the development of acute myocardial infarction[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1140498.
- [28] 任多多, 李珊珊, 薄盼盼, 等. 西洋参多糖对大鼠肠道菌群的影响[J]. 食品科技, 2022, 47(6): 211-217.
REN D D, LI S S, BO P P, et al. Effect of panax quinquefolius polysaccharides on gut microflora in rats[J]. Food Science and Technology, 2022, 47(6): 211-217.