

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003456

基于肠道菌群探讨运动改善 2 型糖尿病小鼠骨髓内皮祖细胞功能的影响研究

陈海燕, 戴霞, 张迷磊, 莫彬彬

(广西医科大学第一附属医院内分泌科, 南宁 530021)

【摘要】目的:探讨有氧联合抗阻运动是否通过改善肠道有益菌群的多样性、丰度、结构及其对 2 型糖尿病小鼠骨髓内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPCs) 功能的影响。**方法:**将 40 只 8 周龄雄性 db/db 小鼠随机分为空白对照组 (DZ 组) 糖尿病模型+有氧联合抗阻运动组 (联合运动) (L 组)、糖尿病模型+粪便移植组 (SY 组)、糖尿病模型组 (TJ 组), 每组 10 只。L 组进行 8 周有氧联合抗阻运动干预, 于周一、周三和周五进行有氧运动, 周二、周四和周六进行抗阻运动, 6 d/周。SY 组和 TJ 组分别采用 L 组运动 8 周后的小鼠粪便和 DZ 组小鼠粪便制成悬浊液予灌肠, 2 次/d, 共 14 d。灌肠结束后检测各组小鼠骨髓 EPCs 增殖、迁移、黏附和体外血管生成能力, 采用流式细胞仪检测鉴定 EPCs 表型 CD34 和 CD31, 16SrRNA 检测各组小鼠粪便肠道菌群的丰度及多样性 ELISA 检测各组小鼠血清胰高血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide 1, GLP-1)。**结果:**肠道菌群多样性结果显示, 在纲水平上, 与 TJ 组比较, SY 组小鼠肠道 Clostridia (54.60% vs. 32.21%) 和 Bacteroidia (47.63% vs. 36.39%) 的丰度上升, Gamma-proteobacteria (0.30% vs. 12.57%) 丰度下降, 差异有统计学意义 ($P=0.019$ 、 $P=0.028$ 、 $P=0.002$) 与 DZ 组比较, SY 组小鼠的肠道 Bacteroidia (47.63% vs. 38.5%) 丰度上升, Bacilli (2.56% vs. 12.36%) 丰度下降, 差异有统计学意义 ($P=0.021$ 、 $P=0.039$)。在科水平上, 与 DZ 组比较, SY 组小鼠肠道产丁酸盐细菌 Lachnospiraceae (43.86% vs. 26.44%) 和 Oscillospiraceae (7.8% vs. 2.15%) 的丰度显著升高 ($P=0.004$ 、 $P=0.001$) 与 TJ 组比较, SY 组小鼠肠道 Lachnospiraceae (43.86% vs. 32.89%)、Lactobacillaceae (9.89% vs. 3.8%) 和 Oscillospiraceae (7.8% vs. 2.21%) 菌群丰度显著升高 ($P=0.045$ 、 $P=0.006$ 、 $P=0.001$)。SY 组小鼠 EPCs 增殖、迁移、黏附和血管生成能力明显高于 DZ 组和 TJ 组 ($P=0.002$ 、 $P=0.000$ 、 $P=0.000$ 、 $P=0.000$ 、 $P=0.016$ 、 $P=0.049$ 、 $P=0.019$ 、 $P=0.026$)。DZ 组 SY 组和 TJ 组 3 组小鼠血清 GLP-1 (pmol/L) 含量 (1.90 ± 0.22 , 2.82 ± 0.40 和 2.24 ± 0.49) 比较, 差异有统计学意义 ($F=31.082$, $P=0.000$)。与 DZ 组比较, SY 组小鼠血清 GLP-1 水平明显升高 ($P=0.000$) 与 TJ 组相比, SY 组小鼠血清 GLP-1 水平显著升高 ($P=0.000$) 肠道菌群数量与内皮祖细胞功能相关性分析结果显示: Clostridia ($r=0.696$, $P=0.041$)、Oscillospiraceae ($r=0.697$, $P=0.037$) Muribaculaceae 与内皮祖细胞迁移能力 ($r=0.753$, $P=0.019$) 和血管生成 ($r=0.810$, $P=0.008$) 呈正相关。**结论:**有氧联合抗阻运动可能通过提高 2 型糖尿病小鼠肠道有益菌的丰度、多样性及结构及提高 GLP-1 表达, 从而改善 2 型糖尿病小鼠骨髓 EPCs 功能。

【关键词】糖尿病; 运动; 胰高血糖素样肽-1; 内皮祖细胞; 肠道菌群; 粪便移植

【中图分类号】R575.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2023-07-19

To investigate the effect of exercise on the function of bone marrow endothelial cells in type 2 diabetic mice based on intestinal flora

Chen Haiyan, Dai Xia, Zhang Milei Mo Binbin

(Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate whether aerobic exercise combined with resistance exercise can improve the diversity, abundance and structure of intestinal beneficial flora and its effect on the function of bone marrow endothelial progenitor cells (EPCs) in type 2 diabetic mice. **Methods:** Forty 8-week-old male db/db mice were randomly divided into control group (DZ group), Diabetic model + aerobic and resistance exercise group (combined exercise) (L group), diabetic model + fecal transplantation group (SY group), and diabetic model group (TJ group), with 10 rats in each group. Group L carried out aerobic exercise combined with resistance exercise for 8 weeks, aerobic exercise on Monday, Wednesday and Friday, and resistance exercise on Tuesday, Thursday and Saturday, 6 days/W. In SY and TJ groups, the feces of mice in group L and DZ after 8 weeks of exercise were made into suspension, respectively, and then enema was given twice a day for 14 days. After the end of enema, the proliferation, migration, adhesion and angiogenesis ability of bone marrow EPCs in each group were detected. The EPCs phenotypes CD34 and CD31 were identified by flow cytometry, and the

作者介绍: 陈海燕, Email: 1356189079@qq.com,

研究方向: 内科护理学。

通信作者: 戴霞, Email: 2655947220@qq.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 8216090327); 广西自然科学基金资助项目 (编号: 2018GXNSFAA050091)。

优先出版: <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240328.1058.032>

(2024-04-01)

abundance and diversity of intestinal flora in feces were detected by 16SrRNA. ELISA was used to detect serum glucagon-like peptide1 (GLP-1) in each group. **Results:** At the class level, the abundance of Clostridia (54.60% vs. 32.21%) and Bacteroidia (47.63% vs. 36.39%) in the SY group was higher than that in the TJ group. The abundance of Gammaproteobacteria (0.30% vs. 12.57%) was significantly decreased ($P=0.019$, $P=0.028$, $P=0.002$). Compared with DZ group, the abundance of Bacteroidia in SY group increased (47.63% vs. 38.5%), and the abundance of Bacilli decreased (2.56% vs. 12.36%), and the difference was statistically significant ($P=0.021$, $P=0.039$). At the family level, the abundance of Lachnospiraceae (43.86% vs. 26.44%) and Oscillospiraceae (7.8% vs. 2.15%) in the SY group was significantly higher than that in DZ group ($P=0.004$, $P=0.001$). Compared with the TJ group, The abundance of Lachnospiraceae (43.86% vs. 32.89%), Lactobacillaceae (9.89% vs. 3.8%) and Oscillospiraceae (7.8% vs. 2.21%) in the intestinal tract of SY group was significantly increased ($P=0.045$, $P=0.006$, $P=0.001$). The proliferation, migration, adhesion and angiogenesis of EPCs in SY group were significantly higher than those in DZ group and TJ group ($P=0.002$, $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.016$, $P=0.049$, $P=0.019$, $P=0.026$). The content of serum glucagon peptide-1 (GLP-1) (pmol/L) in DZ group SY and TJ group (1.90 ± 0.22 , 2.82 ± 0.40 and 2.24 ± 0.49) was significantly different ($F=31.082$, $P=0.000$). Compared with DZ group, the serum GLP-1 level in SY group was significantly increased ($P=0.000$). Compared with TJ group, the serum GLP-1 level in SY group was significantly increased ($P=0.000$). The correlation analysis between the number of intestinal flora and the function of endothelial cells showed that: Clostridia ($r=0.696$, $P=0.041$), Oscillospiraceae ($r=0.697$, $P=0.037$) Muribaculaceae was positively correlated with cell migration ($r=0.753$, $P=0.019$) and angiogenesis ($r=0.810$, $P=0.008$) in the endothelial group. **Conclusion:** Aerobic exercise combined with resistance exercise may improve the function of EPCs in bone marrow of type 2 diabetic mice by increasing the abundance, diversity and structure of beneficial intestinal bacteria and increasing the expression of GLP-1.

[Key words] diabetes mellitus; Exercise; GLP-1; Endothelial progenitor cells; Gut microbiota; Fecal transplantation

糖尿病的心血管并发症是糖尿病患者死亡的主要原因之一,据统计全世界每年因糖尿病及其并发症死亡的人数约有 500 万,占总死亡人数的 8.2%^[1]。其发生机制与内皮损伤及功能异常导致血管新生障碍有关^[2]。内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPCs) 可增殖分化成内皮细胞,能有效发挥促血管新生的作用从而预防糖尿病血管病变^[3]。因此,如何提高机体在糖尿病高糖状态下 EPCs 能力对防治糖尿病心血管并发症有重要意义。

胰高血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide1, GLP-1) 是近年来治疗 2 型糖尿病及其 2 型糖尿病血管并发症的研究热点。研究表明,2 型糖尿病患者 GLP-1 水平升高在促进胰岛 β 细胞分泌、控制血糖、减轻血管炎症损伤及其促进 EPCs 增殖、迁移和修复血管损伤等功能发挥着重要的作用^[4]。因此,机体 GLP-1 与血管 EPCs 功能密切相关,通过提高机体 GLP-1 的水平来改善内皮祖细胞增殖、迁移、黏附及其血管生成能力,是防治 2 型糖尿病血管并发症亟待解决的临床关键问题。运动是糖尿病管理的有效手段,不少国内外文献证实了运动可改善肠道菌群结构,提高与促进 GLP-1 分泌相关的肠道菌群的丰度,如 *Lachnospiraceae*、*Faecalibacterium* 和 *prausnitzii* 等短链脂肪酸 (SCFAs) 细菌群的丰度。^[5-6] 目前关于运动改善 EPCs 功能主要以有氧运动和抗阻运动为主,有氧联合抗阻运动 (联合运动) 对 2

型糖尿病小鼠 EPCs 功能的影响的相关研究较少,且具体通过何种途径尚不明确。本研究将联合运动 8 周后的小鼠粪便制成粪便悬浮液移植入小鼠肠道,干预结束后体外分离培养骨髓源 EPCs,检测各组小鼠 EPCs 功能以及小鼠肠道菌群的丰度和血清 GLP-1 表达。探讨有氧联合抗阻运动是否通过改善肠道菌群丰度和多样性,促进 GLP-1 分泌进而改善 EPCs 能力,为运动改善肠道菌群及预防糖尿病心血管并发症提供新思路。

1 资料与方法

1.1 研究对象及分组

研究对象为:40 只雄性 BKSdb/dbC57 小鼠,8 周龄 (购买于南京君科生物工程有限公司,随机血糖大于 300 mg/L) 作为 2 型糖尿病小鼠模型。将 40 只雄性 BKSdb/dbC57 小鼠随机分为空白对照组 (DZ 组)、糖尿病模型+有氧联合抗阻运动组 (联合运动) (L 组)、糖尿病模型+粪便移植组 (SY 组)、糖尿病模型组 (TJ 组),每组 10 只。

1.2 实验方法

1.2.1 运动干预方法 3 组小鼠均以繁殖饲料喂养,空白对照组期间不做任何干预。糖尿病模型+有氧联合抗阻运动组 (L 组) 采取为期 8 周的联合有氧+抗阻运动干预 (一周运动干预 6 d, 即有氧运动的时间为星期一、三和五抗阻运动为星期二、四和六)。有氧运动方式是小鼠在坡度为 0 度的小鼠跑台 (北京东西仪器科技有限公司,型号:WDW-1 型) 进行有氧跑步运动^[7],具体见表 1。抗阻运动采用尾部负重爬自制梯 (高 1 m, 坡度为 85°) 运动^[8],具体见表 2。

表 1 有氧运动

周次	速度(m/min)	运动时间(min)	坡度(%)
1	10~15	30	0
2~8	15	60	0

表 2 抗阻运动

周次	负重(%BW)	组数与次数(Set×Rep)	坡度(%)
1	10	2×3	85
2	20	2×3	85
3	30	2×3	85
4	50	2×3	85
5~8	70	2×3	85

1.2.2 粪便秘植干预方法 本课题组前期通过对 T2DM 小鼠进行有氧运动、抗阻运动和有氧联合抗阻运动干预 8 周后检测小鼠肠道菌群,结果显示有氧联合抗阻运动方式更有利于提高 2 型糖尿病小鼠肠道菌群有益菌的丰度和组成。基于前期基础,本课题组采用糖尿病模型+有氧联合抗阻运动组小鼠作为粪便采集组,只采集该组小鼠的粪便用于粪便秘植。采用抗生素持续予糖尿病模型+粪便秘植组(SY 组)和糖尿病模型组(TJ 组)小鼠灌胃 4 周。结束后,分别采用糖尿病模型+有氧联合抗阻运动组运动 8 周后的小鼠新鲜粪便和空白对照组小鼠粪便制成悬浊液予灌肠予 SY 组和 TJ 组灌肠,2 次/d,共 14 d。灌肠前 3 h 将 db/db 小鼠放入清洁网笼,轻揉小鼠下腹部及肛门刺激排便,收集新鲜粪便,称重按照粪便与生理盐水 1:5 的比例将两者混合搅拌均匀,按照人类和小鼠每公斤体重的剂量换算系数为 9.01 计算。按 20 mg/kg 算 0.3 g/d,予 0.3 mL 的 500 mg/mL 粪便悬浊液灌肠。

1.2.3 肠道菌群检测 应用 16SrRNA 高通量测序技术测定菌群。称取各组粪便样本各 100 mg,采用 E.Z.N.A.StoolDNA Kit 提取样品的总基因组 DNA,紫外分光光度计下测定 DNA 样品中核酸纯度。针对所有粪便细菌的 16SrRNA V4 区,合成带有 barcode 的特异引物,PCR 反应体系扩增后,对目的条带使用胶回收试剂盒回收纯化产物。Quant iT Pico-Greends DNA Assay Kit 文库试剂盒对纯化产物进行文库的构建,再使用 MiSeq 平台进行上机测序。

1.2.4 物种注释及分类学分析 使用 USEARCH^[9](version 10.0)在相似性 97%(默认)的水平上对序列进行聚类,默认以测序所有序列数的 0.005% 作为阈值过滤 OTUs^[10]。根据 Feature 的序列组成得到其物种分类。对于肠道菌群多样性分析,利用 Alpha 多样性指数分析和 Beta 多样性分布分析展示,在相同物种丰富度的情况下,群落中各物种具有越大的均匀度,则认为群落具有越大的多样性,说明样品的物种多样性越高^[11]。

1.2.5 EPCs 的分离培养与鉴定 干预结束后取材,各组均采用全骨髓贴壁法培养 EPCs。用无菌医用剪刀、镊子分离小鼠肋骨、股骨及胫骨,存放于含抗生素(青霉素-链霉素-两性霉素 B 添加剂)的 FBS 的磷酸缓冲盐溶液(phosphate-buffered saline, PBS)溶液中,紫外线消毒杀菌超净台 30 min 后转移标本,用含三抗的无菌 PBS 反复 3~4 次冲洗骨髓腔,收集骨髓细胞至无菌 50 mL 离心管中,用 1 200 r/min,离心 5 min 后用无菌巴氏吸管吸取出上层细胞冲洗液,加入 PBS

清洗细胞,离心获取细胞沉淀,加入 EGM-2MV 培养基 EPCs,按 $10^6/\text{cm}^2$ 的密度接种于预先用人纤维连接蛋白包被的 25 cm 正方透气盖斜口细胞培养瓶中,置于含有浓度为 5% 二氧化碳培养箱培养,其温度为 37 °C,饱和湿度为 95%。每天在显微镜下观察细胞生长情况,于培养后第 4 d 予细胞第 1 次换液,并在显微镜下观察 EPC 形态及生长情况后加入含有生长因子和胎牛血清的培养基,置于培养箱中培养,之后每隔 48 h 换液。细胞生长增殖到一定数量后对 EPCs 进行流式鉴定,待细胞生长汇合度达到 80% 后对细胞传代培养。对 EPCs 进行,收集 1×10^6 细胞,加入 1 mL PBS 重悬细胞,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清。分别加入含 CD31-PE (5 μL)、CD34-PE (5 μL)、的 100 μL PBS (含 1% BSA),4 °C 避光孵育 20 min。用 PBS (含 1% BSA) 重悬细胞,1 200 r/min 离心 5 min 弃上清。加入 400 μL PBS (含 1% BSA) 悬浮细胞,上机鉴定。

1.2.6 EPCs 增殖功能 ①收集 DZ 组、SY 组和 TJ 组的细胞,调整细胞悬液浓度,使待测细胞调密度至 1×10^5 个/mL,96 孔板每孔加入 100 μL 。②5% CO_2 , 37 °C 分别培养细胞 24 h、48 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,细胞培养箱内继续孵育 1 h,在 450 nm 测定吸光度。

1.2.7 EPCs 迁移功能 采用细胞划痕实验检测细胞迁移功能。计数至 1×10^6 个/mL 各取 1 mL 细胞悬液加入至 6 孔板中,再加入 1 mL 完全培养基,5% CO_2 , 37 °C 培养细胞 24 h 取出,吸去原培养基,用 20 μL 枪头划痕(正中间竖线一道),PBS 清洗 2 次后,在 6 孔板底部用黑色记号笔横线划分三等分,显微镜下分别拍照 3~5 处,并保存数据,加入无血清培养基,再将划痕后的 6 孔板置于 5% CO_2 , 37 °C 培养细胞 48 h,取出吸去原培养基,PBS 清洗 1 次后显微镜下拍照并保存数据。各组 EPCs 分别于 0 h 和 48 h 在倒置荧光/相差显微镜成像分析,并计算其迁移率。

1.2.8 EPCs 黏附功能 ①人纤连蛋白在 96 孔板包被,包被浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,PBS 稀释纤连蛋白原液,每孔加入 50 μL 稀释后的纤连蛋白,即置于 5% CO_2 , 37 °C 细胞培养箱中包被,包被时间为 2 h。②取 DZ 组、SY 组和 TJ 组的细胞消化重悬计数,使各组细胞浓度为 1×10^5 个/mL,弃去孔板中未结合的纤连蛋白,PBS 清洗 2 次后接种细胞,每孔加入 100 μL 细胞悬液。③接种 1 h 后,吸去培养基,PBS 缓缓洗涤细胞 3 次,显微镜下观察各组细胞贴壁情况,每组取 9 个视野进行拍照记录。

1.2.9 EPCs 体外血管生成能力 ①基质胶准备:实验前 1 d 将基质胶置于 4 °C 冰箱过夜,使胶能缓慢融化(同时 4 °C 预冷枪头用于吸取基质胶,同时预冷 96 孔板)。②待基质胶冻融后,用预冷枪头混匀,EP 管提前预冷置于冰盒中,取出预冷的 96 孔板,每孔加入 50 μL 基质胶原液,加入时避免产生气泡,置于细胞培养箱中 60 min 待其凝固。③消化 DZ 组、SY 组和 TJ 组的细胞,计数至 3×10^5 个/mL,每孔加入 100 μL 细胞悬液,细胞培养箱培养 4 h 后显微镜下观察并拍照。

1.2.10 检测 GLP-1 水平 ELISA 法检测小鼠血清 GLP-1。于干预后采用腹腔内注射戊巴比妥钠麻醉小鼠后进行眼球静脉采血,收集的血液静置 2 h 离心分离血清,具体操作方法均按 ELISA 试剂盒说明书进行。

1.3 统计学方法

采用 Image J 软件对图片进行分析、SPSS 26.0 统计软件进行统计分析,符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 法,相关性分析用 Pearson 法或 Spearman 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 运动对 2 型糖尿病小鼠肠道菌群多样性的影响。

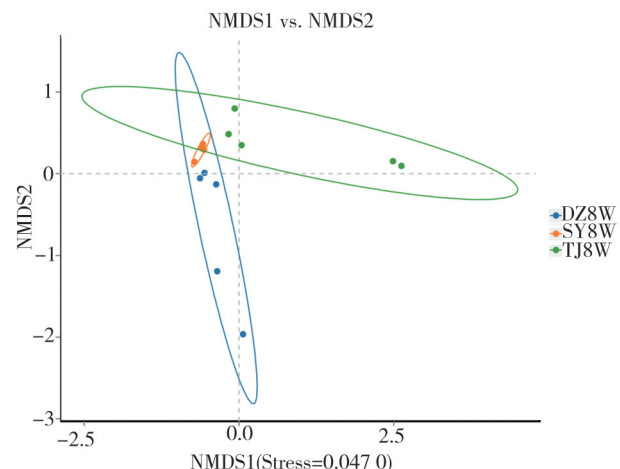
2.1.1 各组小鼠肠道菌群 Alpha 多样性分布 各组小鼠肠道菌群 Alpha 多样性指数结果以 Chao1、Simpson、Shannon、PD_whole_tree 和 ACE 指数来展示。粪便移植后,3 组小鼠肠道菌群 Chao1、Simpson、Shannon、PD_whole_tree 和 ACE 指数差异均有统计学意义 ($F=8.103, P=0.006; F=5.110, P=0.025; F=8.375, P=0.005; F=4.716, P=0.031; F=8.179, P=0.006$)。两两比较结果显示,与 TJ 组比较,SY 组小鼠肠道菌群的 Simpson 升高,差异均有统计学意义 ($P=0.049$) 与 DZ 组比较,SY 组小鼠肠道菌群的 Chao1、Simpson、Shannon、PD_whole_tree 和 ACE 指数升高,差异均有统计学意义 ($P=0.002, P=0.009, P=0.002, P=0.010, P=0.002$)。与 DZ 组比较,TJ 组小鼠肠道菌群的 Chao1、Shannon 和 ACE 指数升高,差异均有统计学意义 ($P=0.017, P=0.017, P=0.017$)。见表 3。

2.1.2 各组小鼠肠道菌群 Beta 多样性分布 非度量多维标度法^[12] (Non-Metric Multi-Dimensional Scaling, NMDS) 基于 Bray-Curtis 距离来进行分析的非线性模型,以点的形式反映在二维平面上。其设计目的是克服线性模型 (包括 PCA、PCoA) 的缺点,更好地反映生态学数据的非线性结构,当 stress 小于 0.05 时,则具有很好的代表性。本研究小鼠肠道菌群 Beta 多样性以 NMDS 表示。如图 1 显示,3 组小鼠肠道菌群具有明显的差异 (stress=0.047 0)。

2.2 联合运动对 2 型糖尿病小鼠肠道菌群结构的影响

2.2.1 各组小鼠肠道菌群在纲(class)水平上分布 粪便移植后,在纲水平上,DZ 组糖尿病小鼠粪便优势菌分别是梭菌纲 (Clostridia) (38.5%),拟杆菌纲 (Bacteroidia) (35.67%)、杆菌纲 (Bacilli) (12.36%) 以及变形菌纲 (Gammaproteobacteria) (3.8%) 这 4 种优势菌约占 93%~96%。TJ 组小鼠肠道梭菌纲、拟杆菌纲、杆菌纲以及变形菌纲分别占 32.21%、36.39%、11.05% 和 12.57%。3 组小鼠肠道菌群在纲水平比较,Clostridia、Bacteroidia 和 Gammaproteobacteria 丰度有统计学意义 ($F=3.971, P=0.047; F=4.421, P=0.036; F=8.816, P=0.005$)。

两两比较结果显示,与 TJ 组比较,SY 组小鼠肠道 Clostridia (54.60%) 和 Bacteroidia (47.63%) 的比例上升 ($P=0.019, P=0.028$),Gammaproteobacteria (0.30%) 丰度下降,差异有统计学意义 ($P=0.002$) 与 DZ 组比较,SY 组小鼠的肠道 Bacteroidia (47.63%) 丰度上升 ($P=0.021$),Bacilli (2.56%) 丰度下降,差异有统计学意义 ($P=0.039$) 与 DZ 组比较,TJ 组小鼠肠道变形菌纲比例上升 ($P=0.014$)。见图 2 和图 3。



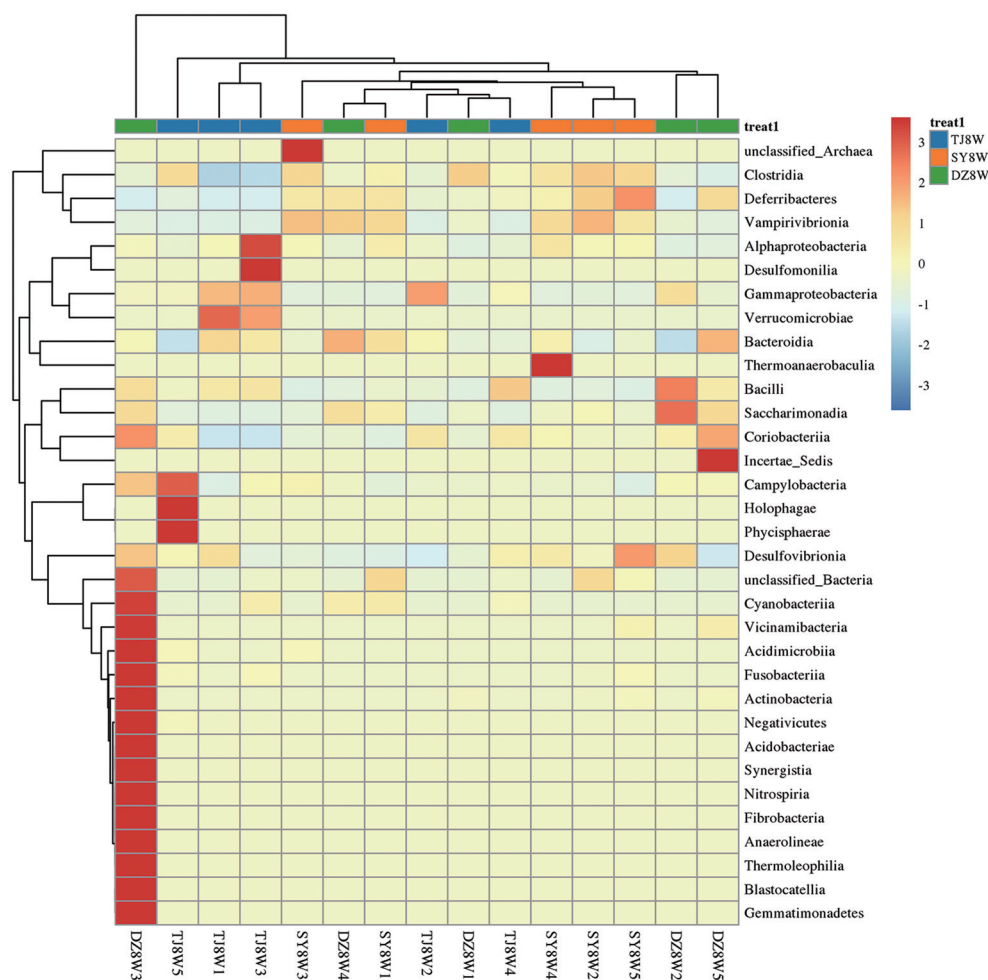
注:DZ,空白对照组;SY,糖尿病模型+粪便移植组;TJ,糖尿病模型组
图1 各组小鼠NMDS分析图

2.2.2 各组小鼠肠道菌群在科(family)水平上分布 干预结束后,本实验结果显示:在科(family)水平上,3 组小鼠肠道菌群丰度在毛螺菌科 (Lachnospiraceae)、乳杆菌科 (Lactobacillaceae) 和颤螺菌科 (Oscillospiraceae) 比较,差异有统计学意义 ($F=6.465, P=0.012; F=5.485, P=0.020; F=12.231, P=0.001$)。DZ 组小鼠肠道毛螺菌科、乳杆菌科和颤螺菌科的丰度分别为 26.44%、5.69% 和 2.15%,TJ 组小鼠肠道毛螺菌科、乳杆菌科和颤螺菌科的丰度分别为 32.89%、3.80% 和 2.21%,两两比较结果显示,与 DZ 组比较,SY 组小鼠肠道产丁酸盐细菌 Lachnospiraceae (43.86%) 和 Oscillospiraceae (7.8%) 的丰度升高,差异均有统计学意义 ($P=0.004, P=0.001$) 与 TJ 组比较,SY 组小鼠肠道 Lachnospiraceae (43.86%)、Lactobacillaceae (9.89%) 和 Oscillospiraceae (7.8%) 菌群丰度升高,差异有统计学意义 ($P=0.045, P=0.006, P=0.001$) DZ 组和 TJ 组小鼠肠道 Lachnospiraceae、Lactobacillaceae 和 Oscillospiraceae 菌群丰度比较,差异无统计学意义 ($P=0.213, P=0.127, P=0.936$)。见图 4。

表 3 各组小鼠肠道菌群 Alpha 多样性指数的比较 ($\bar{x} \pm s$)

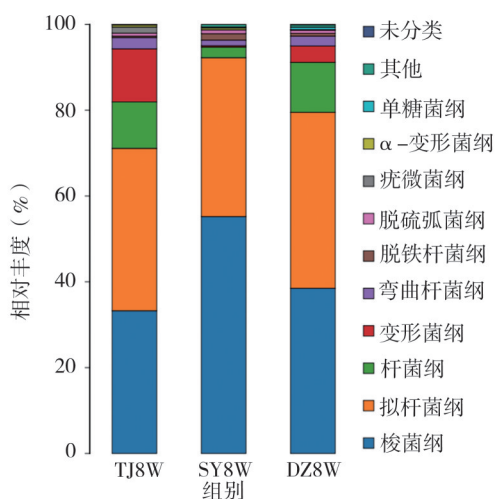
指数	DZ 组	SY 组	TJ 组	F 值	P 值
Chao1	203.96 \pm 107.39	395.28 \pm 50.65 ^a	339.23 \pm 61.73	8.103	0.006
Simpson	0.97 \pm 0.02	0.99 \pm 0.01 ^{ab}	0.97 \pm 0.11	5.110	0.025
Shannon	5.86 \pm 0.95	7.34 \pm 0.16 ^a	6.87 \pm 0.29	8.375	0.005
PD_whole_tree	16.50 \pm 5.94	27.44 \pm 5.85 ^a	22.40 \pm 5.09	4.716	0.031
ACE	204.90 \pm 108.10	397.38 \pm 50.65 ^a	340.98 \pm 60.86	8.179	0.006

注:DZ,空白对照组;SY,糖尿病模型+粪便移植组;TJ,糖尿病模型组;a,与 DZ 组相比, $P<0.05$;b,与 TJ 组相比, $P<0.05$



注: DZ, 空白对照组; SY, 糖尿病模型+粪便移植组; TJ, 糖尿病模型组

图2 各组各个样本在纲水平上的肠道菌群物种分类热图分布

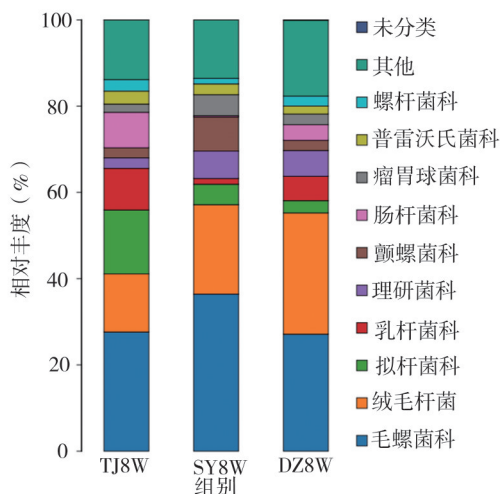


注: DZ, 空白对照组; SY, 糖尿病模型+粪便移植组; TJ, 糖尿病模型组

图3 各组小鼠肠道菌群在纲(class)水平上丰度柱状累加图

2.3 EPCs 细胞形态学观察与鉴定

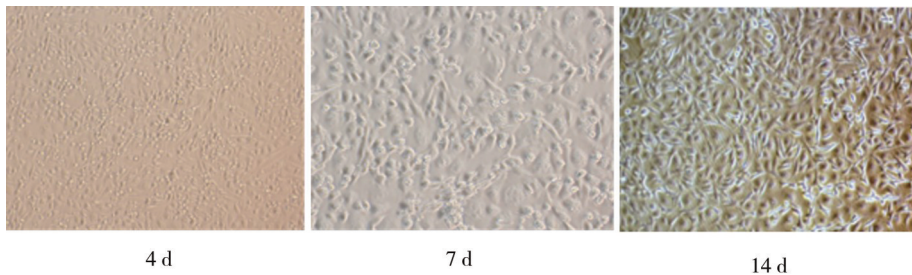
内皮细胞在蛋白包被的培养瓶中培养, 24 h 开始贴壁, 4 d 贴壁基本完全, EPCs 形态大多数呈圆形或椭圆形, 少部分细胞呈长梭形 7 d 后, EPCs 多呈圆形或梭形 14 d 后



注: DZ, 空白对照组; SY, 糖尿病模型+粪便移植组; TJ, 糖尿病模型组

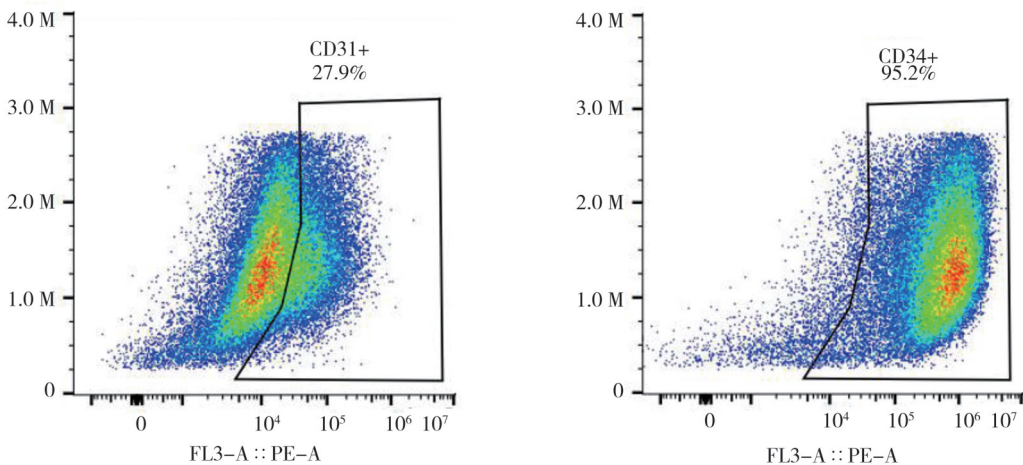
图4 各组小鼠肠道菌群在科(family)水平上丰度柱状累加图

EPCs 不断增殖以梭形细胞增多, 可见“铺石路”状改变, 见图 5。取细胞进行流式细胞术鉴定 EPCs 细胞表面标记, 流式细胞仪检测表型 CD31 和 CD34 检出率分别为 95.2%、27.9%。见图 6。



注:EPCs 形态学观察(倒置显微镜,100×)细胞培养第 4 d 后,EPCs 处于贴壁状态,多呈圆形(左)8 d 后,EPCs 多呈梭形或圆形(中)14 d 后,EPCs 形态呈梭形细胞并大量增殖,长满培养瓶底部,可见有“铺石路”状改变(右)

图5 EPCs 细胞生长情况



注:CD34(左)CD31(右)

图6 流式细胞术鉴定 EPCs 细胞表面标记 CD34 和 CD31 结果

2.4 EPCs 功能

2.4.1 增殖 本研究采用粪便移植干预后观察小鼠 EPCs 的增殖能力,结果显示,3 组小鼠 EPCs 增殖能力差异有统计学意义($F=17.176, P=0.003$)。两两比较结果显示,SY 组小鼠 EPCs 的增殖能力明显比 TJ 组和 DZ 组增强($P=0.002, P=0.000$)。DZ 组与 TJ 组小鼠 EPCs 增殖能力差异无统计学意义($P=0.588$)。见表 4。

2.4.2 粘附 本实验结果显示,3 组小鼠 EPCs 粘附能力差异有统计学意义($F=13.843, P=0.000$)。两两比较结果显示,SY 组小鼠 EPCs 的粘附细胞数量明显多于 DZ 组和 TJ 组(均 $P=0.000$)。DZ 组与 TJ 组小鼠 EPCs 粘附能力差异无统计学意义($P=0.540$)。见图 7 和表 4。

2.4.3 迁移功能 研究结果显示,3 组小鼠 EPCs 迁移能力

差异有统计学意义($F=5.934, P=0.038$)。两两比较结果显示,SY 组小鼠 EPCs 的迁移能力高于 DZ 组和 TJ 组,差异有统计学意义($P=0.016, P=0.049$)。DZ 组与 TJ 组小鼠 EPCs 迁移能力差异无统计学意义($P=0.429$)。见图 8 和表 4。

2.4.4 血管生成功能 3 组小鼠 EPCs 迁移能力差异有统计学意义($F=6.339, P=0.033$)。两两比较结果显示,SY 组小鼠 EPCs 体外血管形成官腔结构明显高于 DZ 组和 TJ 组,差异有统计学意义($P=0.019, P=0.026$)。DZ 组与 TJ 组小鼠 EPCs 血管生成能力差异无统计学意义($P=0.806$)。见图 9 和表 4。

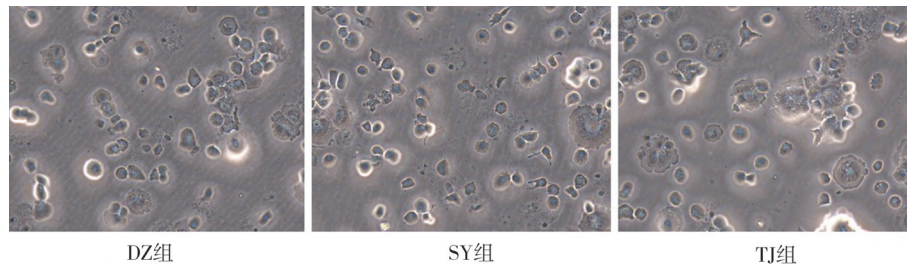
2.5 联合运动对 2 型糖尿病小鼠血清 GLP-1 水平的影响。

粪便移植干预后,DZ 组 SY 组和 TJ 组 3 组小鼠血清 GLP-1 (pmmol/L) 含量 ($1.90 \pm 0.22, 2.82 \pm 0.40$ 和 2.24 ± 0.49) 比较,差异有统计学意义($F=31.082, P=0.000$)。两两

表 4 各组 EPCs 功能比较($\bar{x} \pm s$)

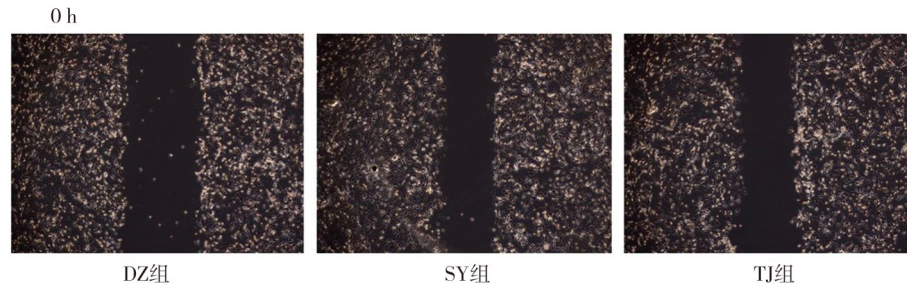
项目	DZ 组	SY 组	TJ 组	F 值	P 值
增殖	0.48 ± 0.30	1.07 ± 0.26^{ab}	0.41 ± 0.30	17.176	0.003
粘附	201.67 ± 17.07	243.11 ± 27.19^{ab}	195.56 ± 16.6	13.843	0.000
迁移	$12\ 571.33 \pm 7\ 509.66$	$45\ 088.00 \pm 18\ 754.12^{ab}$	$20\ 888.00 \pm 4\ 966.20$	5.934	0.038
血管生成	33.67 ± 7.57	58.67 ± 3.21^{ab}	35.67 ± 14.36	6.339	0.033

注:DZ,空白对照组;SY,糖尿病模型+粪便移植组;TJ,糖尿病模型组;a,与 DZ 组相比, $P<0.05$;b,与 TJ 组比较, $P<0.05$



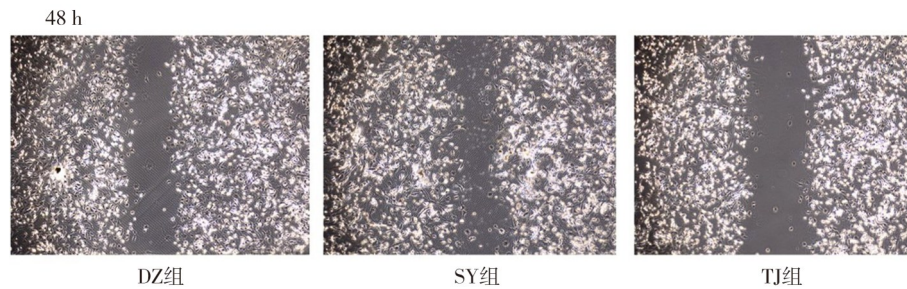
注: DZ 组, 空白对照组; SY 组, 糖尿病模型+粪便移植组; TJ 组, 糖尿病模型组

图 7 EPCs 黏附功能(倒置显微镜, 100×)



注: DZ 组, 空白对照组; SY 组, 糖尿病模型+粪便移植组; TJ 组, 糖尿病模型组

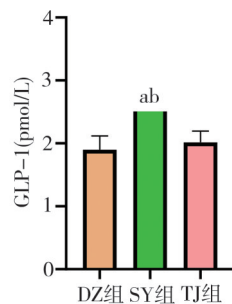
图 8 EPCs 迁移功能(倒置显微镜, 100×)



注: DZ 组, 空白对照组; SY 组, 糖尿病模型+粪便移植组; TJ 组, 糖尿病模型组

图 9 EPCs 血管生成功能(倒置显微镜, 100×)

比较结果显示, 与 DZ 组比, SY 组小鼠血清 GLP-1 水平显著升高, 差异有统计学意义 ($P=0.000$) 与 TJ 组相比, SY 组小鼠血清 GLP-1 水平升高, 差异有统计学意义 ($P=0.000$) TJ 组与 DZ 组相比, 差异无统计学意义 ($P=0.368$)。见图 10。



注: DZ 组, 空白对照组; SY 组, 糖尿病模型+粪便移植组; TJ 组, 糖尿病模型组; a, 与 DZ 组比较, $P < 0.05$; b, 与 TJ 组比较, $P < 0.05$

图 10 各组小鼠血清 GLP-1 水平比较

2.6 肠道菌群与内皮组细胞功能相关性分析。

采用小鼠骨髓内皮组细胞增殖、迁移、黏附和血管生成功能与相应的肠道菌群 (*Clostridia*、*Bacteroidia*、*Bacilli*、*Gammaproteobacteria*、*Lachnospiraceae*、*Muribaculaceae*、*Bacteroidaceae* 和 *Lactobacillaceae*) 的数量分别进行两因素相关性分析。结果显示, *Clostridia* ($r=0.696$, $P=0.041$)、*Oscillospiraceae* ($r=0.697$, $P=0.037$) *Muribaculaceae* 与内皮组细胞迁移能力 ($r=0.753$, $P=0.019$) 和血管生成 ($r=0.810$, $P=0.008$) 呈正相关。见表 5。

2.7 联合运动对小鼠摄食量的影响

实验期间小鼠未发生呕吐、腹泻、便秘、便血精神萎靡及死亡等不良情况, 小鼠均可正常饮食饮水。每周同一时间测量小鼠 24 h 摄食量和粪便量, 小鼠 24 摄食量结果显示, 根据重复测量设计方差分析, 数据满足球形检验 ($\chi^2=22.331$, $P=0.079$), 故选择球形检验结果, 即分组效应、组别与时间的交互作用、时间效应对 24 h 摄食量的影响均有统计学差异 ($F_{\text{组别}}=14.401$, $P_{\text{组别}}=0.001$; $F_{\text{时间}}=332.039$, $P_{\text{时间}}=0.000$; $F_{\text{交互}}=$

9.989, $P_{交互}=0.000$)。组别简单效应检验结果显示,除了在第 1 周,组别的简单效应不明显 ($F=1.857, P=0.198$, 偏 $\eta^2=0.236$), 在第 2、3、4、5 和 6 周,组别的简单效应均明显 ($F=8.240, P=0.006$, 偏 $\eta^2=0.579$; $F=36.51, P=0.000$, 偏 $\eta^2=0.859$; $F=18.794, P=0.000$, 偏 $\eta^2=0.758$; $F=3.978, P=0.047$, 偏 $\eta^2=0.399$; $F=6.000, P=0.016$, 偏 $\eta^2=0.5$)。时间简单效应分析结果显示:DZ 组、SY 组和 TJ 组在 3 种不同方式干预下,时间的简单效应均明显 ($F=67.622, P=0.000$, 偏 $\eta^2=0.977$; $F=46.547, P=0.000$, 偏 $\eta^2=0.967$; $F=52.591, P=0.000$, 偏 $\eta^2=0.970$)。组间各时间点两两比较结果显示,与 DZ 组比较,SY 组小鼠 24 h 摄食量在第 2、3、4 和 6 周差异有统计学意义 ($P=0.002, P=0.000, P=0.000, P=0.006$)。与 TJ 组比较,SY 组小鼠 24 h 摄食量在第 3、5 和 6 周差异有统计学意义 ($P=0.037, P=0.017, P=0.033$)。见表 6。

2.8 联合运动对小鼠 24 h 粪便量的影响。

根据重复测量设计方差分析,数据满足球形检验 ($\chi^2=$

12.758, $P=0.558$),故选择球形检验结果,即分组效应、组别与时间的交互作用、时间效应对 24 h 摄食量的影响均有统计学差异 ($F_{组别}=10.441, P_{组别}=0.002$; $F_{时间}=74.201, P_{时间}=0.000$; $F_{交互}=3.104, P_{交互}=0.003$)。组别简单效应检验结果显示,除了在第 1 周,组别的简单效应不明显 ($F=0.083, P=0.092$, 偏 $\eta^2=0.014$), 在第 2、3、4、5 和 6 周,组别的简单效应均明显 ($F=6.964, P=0.010$, 偏 $\eta^2=0.537$; $F=4.696, P=0.031$, 偏 $\eta^2=0.439$; $F=5.014, P=0.026$, 偏 $\eta^2=0.445$; $F=8.164, P=0.006$, 偏 $\eta^2=0.576$; $F=4.419, P=0.036$, 偏 $\eta^2=0.424$)。时间简单效应分析结果显示:DZ 组、SY 组和 TJ 组在 3 种不同方式干预下,时间的简单效应均明显 ($F=21.147, P=0.000$, 偏 $\eta^2=0.930$; $F=10.012, P=0.003$, 偏 $\eta^2=0.862$; $F=26.233, P=0.000$, 偏 $\eta^2=0.943$)。组间各时间点两两比较结果显示,与 DZ 组比较,SY 组小鼠 24 h 排便量在第 2 和 3 周差异有统计学意义 ($P=0.004, P=0.021$)。与 TJ 组比较,SY 组小鼠 24 h 摄食量在第 5 差异有统计学意义 ($P=0.003, P=0.012$)。见表 7。

表 5 肠道菌群与 EPCs 功能相关性分析

肠道菌群	细胞增殖		细胞迁移		细胞粘附		血管生成功能	
	r/r_s 值	P 值	r/r_s 值	P 值	r/r_s 值	P 值	r/r_s 值	P 值
<i>Clostridia</i>	0.696	0.041	-0.330	0.386	-0.012	0.965	-0.044	0.226
<i>Bacteroidia</i>	0.276	0.473	0.381	0.311	0.211	0.450	0.483	0.188
<i>Oscillospiraceae</i>	0.697	0.037	-0.294	0.443	0.031	0.913	-0.330	0.385
<i>Gammaproteo-bacteria</i>	-0.223	0.546	-0.447	0.228	0.257	0.335	-0.412	0.270
<i>Lachnospiraceae</i>	0.541	0.132	-0.346	0.361	0.128	0.650	-0.479	0.192
<i>Muribaculaceae</i>	-0.629	0.070	0.753	0.019	-0.467	0.079	0.810	0.008
<i>Bacteroidaceae</i>	0.276	0.473	0.381	0.311	0.211	0.450	0.483	0.188
<i>Lactobacillaceae</i>	0.518	0.153	-0.315	0.409	0.304	0.274	-0.159	0.682

表 6 各组小鼠不同时间点 24 h 摄食量(克)的比较($\bar{x} \pm s$)

时间	DZ 组	SY 组	TJ 组	F 值	P 值
第 1 周	2.60 \pm 0.38	2.98 \pm 0.15	2.82 \pm 0.36	1.857	0.198
第 2 周	3.56 \pm 0.19	4.22 \pm 0.33 ^a	4.10 \pm 0.27	8.240	0.006
第 3 周	4.02 \pm 0.18	5.50 \pm 0.35 ^{ab}	5.08 \pm 0.29	36.510	0.000
第 4 周	4.98 \pm 0.34	6.08 \pm 0.24 ^a	5.84 \pm 0.30	18.794	0.000
第 5 周	5.92 \pm 0.51	5.70 \pm 0.37 ^b	6.38 \pm 0.24	3.978	0.047
第 6 周	6.90 \pm 0.26	6.20 \pm 0.39 ^{ab}	6.70 \pm 0.32	6.000	0.016

注:DZ 组,空白对照组;SY 组,糖尿病模型+粪便移植组;TJ 组,糖尿病模型组; $F_{组别}=14.401, P_{组别}=0.001$; $F_{时间}=332.039, P_{时间}=0.000$; $F_{交互}=9.989, P_{交互}=0.000$; a, 与 DZ 组比较, $P < 0.05$; b, 与 TJ 组比较, $P < 0.05$

表 7 各组小鼠不同时间点 24 h 排便量(颗)的比较($\bar{x} \pm s$)

时间	DZ 组	SY 组	TJ 组	F 值	P 值
第 1 周	83.60 \pm 3.64	82.60 \pm 5.77	83.80 \pm 5.26	0.082	0.920
第 2 周	84.60 \pm 3.65	96.40 \pm 5.68 ^a	93.80 \pm 6.10 ^c	6.964	0.010
第 3 周	91.40 \pm 9.21	103.80 \pm 4.27 ^a	103.80 \pm 7.80 ^c	4.696	0.031
第 4 周	103.20 \pm 3.27	108.60 \pm 4.34	115.40 \pm 9.07 ^c	5.014	0.026
第 5 周	108.40 \pm 2.30	106.20 \pm 4.60 ^b	120.00 \pm 8.63 ^c	8.164	0.006
第 6 周	113.80 \pm 4.82	110 \pm 3.81 ^b	120.40 \pm 7.50	4.419	0.060

注:DZ 组,空白对照组;SY 组,糖尿病模型+粪便移植组;TJ 组,糖尿病模型组; $F_{组别}=10.441, P_{组别}=0.002$; $F_{时间}=74.201, P_{时间}=0.000$; $F_{交互}=3.104, P_{交互}=0.003$; a, 与 DZ 组比较, $P < 0.05$; b, 与 TJ 组比较, $P < 0.05$

3 讨 论

运动是改善 2 型糖尿病的“五驾马车”之一。有研究表明运动可提高有益菌的数量和丰度,降低有害菌的数量,从而促进宿主健康^[13-14]。前期研究结果亦表明有氧联合抗阻运动 8 周的小鼠肠道菌群多样性和有益菌群的组成丰度及小鼠骨髓内皮组细胞功能优于单一的有氧运动或抗阻运动^[15-16]。而 EPCs 的数量和功能与某些肠道菌群密切相关。Sommese L 等^[17]使用细菌 *B.henselae* 喂养小鼠后,其循环 EPCs 数量下降,而使用细菌 *B.fragilis* 喂养小鼠后能拮抗细菌 *B.henselae* 引起的 EPCs 数量下降。补充益生菌 *LisosanG* 或乳酸菌能阻止脂多糖损害 EPCs 的活性和功能^[18-19]。但运动如何影响 EPCs 的功能的具体机制尚未明确。

为了探究有氧联合抗阻运动以何种方式影响 2 型糖尿病患者 EPCs 的功能,将有氧联合抗阻运动后小鼠的粪便移植入无菌小鼠后,对各组小鼠的骨髓 EPCs 的功能进行检测。本研究结果显示:运动提高了肠道菌群的多样性和结构,干预后,SY 组小鼠肠道菌群的 Chao1、Simpson、Shannon、PD_whole-tree 和 ACE 指数高于 DZ 组,与 Liu Y^[20]等研究一致。在纲(class)水平上,与 TJ 组比较,SY 组小鼠的梭菌纲和拟杆菌纲的比例上升。变形菌纲比例下降与 DZ 组比较,SY 组小鼠的肠道菌群拟杆菌纲比例上升与 Friques AG 等^[19]研究一致。在科(family)水平上,与 DZ 组比较,SY 组小鼠产丁酸盐细菌毛螺菌科(*Lachnospiraceae*)和颤螺菌科(*Oscillospiraceae*)的肠道菌群丰度显著升高。与 TJ 组比较,SY 组毛螺菌科(*Lachnospiraceae*)、乳杆菌科(*Lactobacillaceae*)和颤螺菌科(*Oscillospiraceae*)的肠道菌群丰度显著升高。与 Yang WQ 等^[21]研究一致。本研究还发现肠道菌群中有益菌与内皮组细胞功能具有显著相关性,内皮组细胞功能随着有益菌的丰度的升高而增强。提示有氧联合抗阻运动改善 2 型糖尿病 EPCs 功能的途径可能通过提高肠道菌群有益菌的丰度和结构及多样性增加循环中 EPCs 的数量,促进损伤血管的修复能力,预防 2 型糖尿病血管并发症的发生。

肠道菌群可能通过其代谢产物影响宿主健康,肠道菌群的代谢产物如短链脂肪酸、氧化三甲胺等则会加剧心血管疾病的发生发展。研究表明运动可通过提高梭状芽孢杆菌科、乳杆菌科等产丁酸盐类菌群的丰度产短链脂肪酸(short-chain fattyacids,

SCFA)的有菌群产生^[22],SCFA 可刺激胰高血糖素样肽 1(GLP-1),从而促胰岛素分泌、降低血糖以及改善胰岛素抵抗性^[23],机体 GLP-1 水平增加可通过调节 GLP-1 受体依赖途径和非依赖途径促进 EPCs 增殖与分化^[24-26]。Yin HG 等^[27]研究报道,EPCs 加入 GLP-1 干预后,EPCs 的增殖、黏附和血管生成功能增强。本研究结果表明采用有氧联合抗阻运动组粪便移植后,SY 组小鼠产 SCFA 的有益菌毛螺菌科、乳杆菌科和粪球菌科的丰度和数量高于 DZ 组和 TJ 组,GLP-1 水平及 EPCs 增殖、迁移、黏附和体外血管生成功能亦高于其 DZ 组和 TJ 组。运动还可能通过降低氧化三甲胺(trimethylamine-N-oxide, TMAO)降低 2 型糖尿病心血管发生风险。1 项对胰岛素抵抗的患者进行 12 周的运动干预研究发现,有氧运动组的患者血浆 TMAO 水平及颈动脉内膜内侧厚度明显减少,患心血管疾病风险随之降低^[28],TMAO 水平升高与动脉粥样硬化、血栓形成、心力衰竭等发病风险升高正相关^[29]。而与 TMAO 代谢相关的肠道菌群有梭状芽孢杆菌、埃希氏菌、肠杆菌、不动杆菌、变形杆菌^[30]。该研究发现运动粪便移植后,SY 组小鼠杆菌纲及变形菌纲比例下降,小鼠体内 TMAO 水平可能下降,从而预防了血管损伤。此外,运动可减轻氧化应激损伤,氧化应激反应是糖尿病血管损伤的中心环节,肠道菌群在机体抗氧化系统中具有重要作用。研究显示,摄入益生菌可有效提高抗氧化水平,降低超氧阴离子和过氧化氢的活性^[31]。肠道菌群可以介导非酶途径,通过还原硝酸盐,增加一氧化氮的水平,促进内皮组细胞生长,减少内皮组细胞功能障碍及血管损伤。

综上所述,联合有氧-抗阻运动可能通过增加肠道菌群有益菌的数量、丰度及多样性及促进 GLP-1 分泌、降低 TMAO 水平及氧化应激反应,从而改善 2 型糖尿病小鼠内皮组细胞的功能,从而防治 2 型糖尿病心血管病变。本研究将以运动改善肠道菌群为靶点,为预防糖尿病及其血管并发症提供临床依据。有关有氧联合抗阻运动通过调节肠道菌群改善 EPCs 功能的具体机制有待深入研究。

参 考 文 献

- [1] Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, et al. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2014, 103(2): 137-149.
- [2] 翟 露, 刘玉花, 黄燕凤, 等. 内皮祖细胞在防治糖尿病血管并发症的应用前景[J]. 重庆医科大学学报, 2020, 45(3): 301-305.
- Zhai L, Liu YH, Huang YF, et al. Application prospect of endothelial

progenitor cells on prevention and treatment of diabetes-related cardiovascular diseases[J]. J Chongqing Med Univ, 2020, 45(3): 301-305.

[3] Rigato M, Bittante C, Albiero M, et al. Circulating progenitor cell count predicts microvascular outcomes in type 2 diabetic patients[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2015, 100(7): 2666-2672.

[4] 康 岩. GLP-1 对氧化诱导内皮细胞损伤的影响[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2015.

Kang Y. The effects of GLP-1 on human umbilical vein endothelial cell after oxidative stress stimulation[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2015.

[5] 王泽坤, 徐 欣, 周学东, 等. 肠道菌群代谢产物在心血管疾病中的作用及机制研究[J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(6): 102-107.

Wang ZK, Xu X, Zhou XD, et al. Role and mechanisms of intestinal microbial metabolites in cardiovascular disease[J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(6): 102-107.

[6] Wang YM, Dilidaxi D, Wu YC, et al. Composite probiotics alleviate type 2 diabetes by regulating intestinal microbiota and inducing GLP-1 secretion in db/db mice[J]. Biomedicine Pharmacother, 2020, 125: 109914.

[7] Lin YY, Lee SD, Su CT, et al. Long-term treadmill training ameliorates endothelium-dependent vasorelaxation mediated by insulin and insulin-like growth factor-1 in hypertension[J]. J Appl Physiol, 2015, 119(6): 663-669.

[8] Lee S, Farrar R. Resistance training induces muscle-specific changes in muscle mass and function in rat[J]. J Exerc Physiol, 2003, 6: 80-87.

[9] Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nat Methods, 2013, 10(10): 996-998.

[10] Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing[J]. Nat Methods, 2013, 10(1): 57-59.

[11] Grice EA, Kong HH, Conlan S, et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome[J]. Science, 2009, 324(5931): 1190-1192.

[12] Looft T, Johnson TA, Allen HK, et al. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(5): 1691-1696.

[13] Codella R, Luzi L, Terruzzi I. Exercise has the guts: how physical activity may positively modulate gut microbiota in chronic and immune-based diseases[J]. Dig Liver Dis, 2018, 50(4): 331-341.

[14] Sohail MU, Yassine HM, Sohail A, et al. Impact of physical exercise on gut microbiome, inflammation, and the pathobiology of metabolic disorders[J]. Rev Diabet Stud, 2019, 15: 35-48.

[15] 刘玉花, 翟 露, 黄燕凤, 等. 运动对 2 型糖尿病小鼠内皮祖细胞功能的影响[J]. 现代预防医学, 2019, 46(13): 2424-2430, 2444.

Liu YH, Zhai L, Huang YF, et al. Effect of sports training on functions of endothelial progenitor cells in mice with type 2 diabetes[J]. Mod Prev Med, 2019, 46(13): 2424-2430, 2444.

[16] 韦 薇, 张 秋, 黄燕凤, 等. 不同运动方式对 2 型糖尿病小鼠肠道菌群及短链脂肪酸的影响[J]. 广西医科大学学报, 2022, 39(4): 643-648.

Wei W, Zhang Q, Huang YF, et al. Effects of different exercise modes on intestinal flora and short-chain fatty acids in mice with type 2 diabetes[J]. J Guangxi Med Univ, 2022, 39(4): 643-648.

[17] Sommese L, Pagliuca C, Avallone B, et al. Evidence of *Bacteroides fragilis* protection from *Bartonella henselae*-induced damage[J]. PLoS One, 2012, 7(11): e49653.

[18] Giusti L, Gabriele M, Penno G, et al. A fermented whole grain prevents lipopolysaccharides-induced dysfunction in human endothelial progenitor cells[J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017: 1026268.

[19] Friques AG, Arpini CM, Kalil IC, et al. Chronic administration of the probiotic kefir improves the endothelial function in spontaneously hypertensive rats[J]. J Transl Med, 2015, 13: 390.

[20] Liu Y, Wang Y, Ni YQ, et al. Gut microbiome fermentation determines the efficacy of exercise for diabetes prevention[J]. Cell Metab, 2020, 31(1): 77-91.e5.

[21] Yang WQ, Liu YQ, Yang G, et al. Moderate-intensity physical exercise affects the exercise performance and gut microbiota of mice[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 712381.

[22] Monda V, Villano I, Messina A, et al. Exercise modifies the gut microbiota with positive health effects[J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017: 3831972.

[23] Estaki M, Pither J, Baumeister P, et al. Cardiorespiratory fitness as a predictor of intestinal microbial diversity and distinct metagenomic functions[J]. Microbiome, 2016, 4(1): 42.

[24] 刘 峰, 许文琼, 闵 娜, 等. GLP-1 通过 SDF-1/CXCR4 信号通路调控人脐血内皮祖细胞增殖、分化和凋亡[J]. 天津医药, 2015, 43(5): 457-460.

Liu F, Xu WQ, Min N, et al. GLP-1 regulates proliferation, differentiation and apoptosis of endothelial progenitor cells isolated from human umbilical cord blood by targeting the SDF-1/CXCR4 signaling pathway[J]. Tianjin Med J, 2015, 43(5): 457-460.

[25] Erdogdu O, Nathanson D, Sjöholm A, et al. Exendin-4 stimulates proliferation of human coronary artery endothelial cells through eNOS-, PKA- and PI3K/Akt-dependent pathways and requires GLP-1 receptor[J]. Mol Cell Endocrinol, 2010, 325(1/2): 26-35.

[26] Erdogdu O, Eriksson L, Xu H, et al. Exendin-4 protects endothelial cells from lipoprotein-induced apoptosis by PKA, PI3K, eNOS, p38 MAPK, and JNK pathways[J]. J Mol Endocrinol, 2013, 50(2): 229-241.

[27] Yin HG, Huang JH, Hu M. Moderate-intensity exercise improves endothelial function by altering gut microbiome composition in rats fed a high-fat diet[J]. J Nippon Med Sch, 2022, 89(3): 316-327.

[28] Erickson ML, Malin SK, Wang ZN, et al. Effects of lifestyle intervention on plasma trimethylamine N-oxide in obese adults[J]. Nutrients, 2019, 11(1): 179.

[29] Lee Y, Wang Z, Lai H, et al. Longitudinal measures of trimethylamine N-oxide and incident atherosclerotic cardiovascular disease events in older adults: the cardiovascular health study[J]. Curr Dev Nutr, 2020, 4(suppl 2): 1434.

[30] Al-Obaide MAI, Singh R, Datta P, et al. Gut microbiota-dependent trimethylamine-N-oxide and serum biomarkers in patients with T2DM and advanced CKD[J]. J Clin Med, 2017, 6(9): 86.

[31] Wang X, Bao W, Liu J, et al. Inflammatory markers and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis[J]. Diabetes Care, 2013, 36(1): 166-175.

(责任编辑: 李青颖)