

基于菌群人源化模型探究乌梅丸加减对湿热瘀阻证 溃疡性结肠炎 Th17/Treg 平衡及肠道菌群的调节作用

张崇豪, 马沛广, 刘华琛, 苏佳龙, 刘洁, 李亚兰,
徐贵川, 李娜*, 彭桂英*
(北京中医药大学 生命科学学院, 北京 100029)

[摘要] 目的: 该研究旨在利用湿热瘀阻证溃疡性结肠炎(UC)患者的菌群人源化小鼠模型, 以探讨乌梅丸加减对 UC 相关的肠道辅助性 T 细胞 17(Th17)/调节性 T 细胞(Treg)免疫平衡及肠道菌群的调节作用, 为 UC 的相关研究和治疗策略提供新的思路和依据。方法: 选取 24 只雄性 C57BL/6J 小鼠作为实验对象, 将小鼠随机分为正常组、模型组和乌梅丸加减组, 每组 8 只。模型组和乌梅丸加减组首先给予含四联抗生素(万古霉素 0.1 g·kg⁻¹、硫酸新霉素 0.2 g·kg⁻¹、氨苄青霉素 0.2 g·kg⁻¹、甲硝唑 0.2 g·kg⁻¹)的水溶液, 持续 21 d。抗生素清菌结束后, 开始灌胃湿热瘀阻证 UC 患者粪便菌悬液, 灌胃剂量 0.2 mL·d⁻¹, 连续灌胃 19 d, 以此获得 UC 菌群人源化小鼠模型。治疗组每日灌胃乌梅丸加减药液(12.5 g·kg⁻¹), 正常组和模型组灌胃等量无菌水, 连续灌胃 7 d。观察相关湿热症候, 检测小鼠的结肠长度和脾指数, 流式检测 Th17、Treg 细胞比例。应用 16S rRNA 高通量测序技术对肠道菌群进行基因测序, 观察肠道菌群落的变化。结果: 与正常组比较, 模型组的小鼠结肠长度缩短($P<0.05$), 脾脏指数显著升高($P<0.01$)。乌梅丸加减治疗小鼠较模型组的结肠长度显著增加($P<0.01$), 而脾脏指数明显降低($P<0.05$)。与模型组比较, 乌梅丸加减组结肠 Th17、Th17/Treg 显著下降($P<0.01$), Treg 比例升高($P<0.05$)。肠道菌群方面, 乌梅丸加减显著调节小鼠的物种数量及 α 与 β 多样性($P<0.05$)。物种组成方面, 乌梅丸加减显著增加 UC 菌群人源化小鼠的厚壁菌门、变形菌门、梭杆菌门、放线菌门、芽单胞菌门等丰度, 同时上调了拟杆菌属等菌属和多形拟杆菌、脆弱拟杆菌等菌种的丰度。Spearman 相关性分析显示, 多形拟杆菌、脆弱拟杆菌等的相对丰度与 Th17 水平呈明显负相关($P<0.05$)。此外, 上述肠道菌群的改变可引起涉及糖酵解、氨基酸降解、无机营养素代谢、生物合成嘧啶脱氧核糖核苷酸、抗生素耐药性、多聚糖降解等 14 个通路功能的菌群基因功能的改变。结论: 菌群人源化小鼠模型较好地模拟了湿热证 UC 患者以拟杆菌属减少为主要标志的菌群结构变化, 乌梅丸加减可能通过富集多形拟杆菌、脆弱拟杆菌等肠道有益菌的丰度, 通过细菌多糖利用位点促进以糖酵解为核心、氨基酸代谢、核苷酸合成等菌群代谢功能协同的肠道免疫调控, 降低 Th17/Treg 细胞比例, 从而对 UC 发挥保护效应。

[关键词] 乌梅丸加减; 溃疡性结肠炎; 粪菌移植; 菌群人源化; 肠道菌群

[中图分类号] R259; R285; R242 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2025)20-0086-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20242337

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20241226.1440.002>

[网络出版日期] 2024-12-27 12:53:33 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Regulatory Effect of Modified Wumeiwan on Th17/Treg Balance and Intestinal Microbiota in Ulcerative Colitis with Dampness-heat Obstruction Syndrome in Human Flora-associated Model

ZHANG Chonghao, MA Peiguang, LIU Huachen, SU Jialong, LIU Jie, LI Yalan, XU Guichuan,
LI Na*, PENG Guiying*

(School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[收稿日期] 2024-10-25

[基金项目] “十三五”国家重点研发计划项目(2018YFC1705405);国家自然科学基金青年基金项目(82204888);北京中医药大学基本科研业务费项目(2019-JYB-TD014, 2023-JYB-JBQN-040)

[第一作者] 张崇豪, 在读硕士, 从事中医药免疫调节作用研究, E-mail: 20220931161@bucm.edu.cn

[通信作者] * 彭桂英, 博士, 教授, 从事中医药免疫调节作用研究, E-mail: penggy@bucm.edu.cn;

* 李娜, 博士, 副研究员, 从事中医药免疫调节作用研究, E-mail: nali@bucm.edu.cn

[Abstract] **Objective:** To investigate the modulating effect of modified Wumeiwan (MWMW) on the ulcerative colitis (UC)-associated intestinal helper T cell 17 (Th17)/regulatory T cell (Treg) balance and intestinal flora by using a human flora-associated model of UC patients with dampness-heat obstruction syndrome, thus providing a new idea for the UC-related research and therapeutic strategies. **Methods:** The 24 male C57BL/6J mice were randomized into normal control, model, and MWMW groups ($n=8$). Model and MWMW groups were first treated with an antibiotic cocktail (vancomycin, $0.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$; neomycin sulfate, $0.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$; ampicillin, $0.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$; metronidazole, $0.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) for 21 days. At the end of antibiotic treatment, the gavage of fecal microbiota suspension from UC patients with dampness-heat obstruction syndrome was started at a dose of $0.2 \text{ mL}\cdot\text{d}^{-1}$ for 19 consecutive days, by which a human flora-associated model of UC was obtained. The MWMW group was administrated daily with MWMW liquid ($12.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), while the normal control and model groups were administrated by gavage with an equal amount of sterile water for 7 consecutive days. The symptoms of dampness-heat obstruction were observed. The colon length and spleen index were measured and calculated, and the proportions of Th17 and Treg cells were detected by flow assay. The intestinal flora was analyzed by 16S rRNA high-throughput sequencing. **Results:** Compared with the normal control group, the model group showed shortened colon ($P<0.05$) and increased spleen index ($P<0.01$). Compared with the model group, the MWMW group showed prolonged colon ($P<0.01$) and decreased spleen index ($P<0.05$). After the intervention of MWMW, the Th17 proportion and Th17/Treg ratio in the colon decreased ($P<0.01$), and the proportion of Treg cells increased ($P<0.05$). The number of species and alpha and beta diversity of intestinal flora in mice were regulated by MWMW ($P<0.05$). In terms of intestinal flora composition, MWMW increased the relative abundance of several phyla (Firmicutes, Proteobacteria, Fusobacteriota, Actinobacteriota, and Gemmatimonadota), the genus *Bacteroides*, and two species (*Bacteroides thetaiotaomicron* and *B. fragilis*) in model mice. Moreover, Spearman's correlation analysis showed that the relative abundance of *B. thetaiotaomicron* and *B. fragilis* were negatively correlated with the Th17 level ($P<0.05$). In addition, the above changes in intestinal flora caused the changes in microbial genes involved in 14 pathways, such as glycolysis, amino acid degradation, inorganic nutrient metabolism, biosynthesis of pyrimidine deoxyribonucleotides, antibiotic resistance, and degradation of polysaccharides. **Conclusions:** The human flora-associated model successfully simulated the changes (marked by a decrease in the abundance of *Bacteroides*) of intestinal flora in UC patients with dampness-heat obstruction syndrome. MWMW can enrich the abundance of beneficial bacteria such as *B. thetaiotaomicron* and *B. fragilis* and promote the synergistic intestinal immune modulation with the metabolic functions centered on glycolysis, amino acid metabolism, and nucleotide synthesis through bacterial polysaccharide utilization sites to reduce the Th17/Treg ratio, thereby exerting a protective effect on UC.

[Keywords] modified Wumeiwan; ulcerative colitis; fecal microbiota transplantation; human-associated flora; intestinal flora

溃疡性结肠炎(UC)是慢性炎症性肠病(IBD)的一种亚型,其特征是结肠黏膜表面的复发性炎症,临床表现为腹泻、腹痛、黏液脓血便等。UC因其高发病率、患者生活质量下降和结肠炎相关结肠癌进展密切相关,已日益成为全球公共卫生挑战^[1]。其中,肠道菌群的扰动和辅助性T细胞17(Th17)/调节性T细胞(Treg)失衡被认为是引发UC炎症的重要因素^[2]。胃肠道和共生微生物群构成的生态系统,有助于肠壁的完整性并维持免疫稳态^[3],而肠道菌群紊乱显著影响UC患者中Th17/Treg细胞平衡,从而加剧肠道中的炎症反应^[2]。因此,基于这一机制积极寻找安全有效的UC治疗方法具有重要意义。

UC临床治疗常采用5-氨基水杨酸、糖皮质激素、免疫抑制剂等药物,虽然短期内疗效显著,但长期使用可能伴随不良反应,并有复发的风险。相对而言,中医治疗策略提供了不同的视角^[4-5]。在中医理论中,UC被归类为“泄泻”“痢疾”“肠澼”等范畴。古代医圣张仲景的《伤寒论》对此类病症有所论述,

源于文中的乌梅丸是辛开苦降、清上温下、寒温并施的代表方,其主要成分和复方在缓解患者临床症状、改善及修复肠黏膜、调节免疫功能、调节肠道菌群、抗氧化损伤等方面均具有良好疗效^[6-8]。北京中医药大学东方医院在原乌梅丸方基础上进行加减,形成院内临床常用验方,临床治疗UC患者效果良好。

近些年,基于人-鼠粪菌移植的菌群人源化小鼠模型已得到了广泛应用^[9-11],该模型能够更准确地模拟和理解UC在微生物-胃肠道稳态变化影响下的发展及病理机制,为研究UC等人类肠病的发病机制、病理变化及治疗效果评价提供了重要的实验工具。大肠湿热证作为活动期UC的最主要证型^[12],其生物学内涵具有重要的研究价值,因此本课题组选取活动期中医辨证为湿热瘀阻证的UC患者的粪便菌群移植至抗生素清菌小鼠体内以构建UC人源化菌群模型,成功地在受体小鼠中重现了与患者相似的结肠炎症及关键微生物表型变化特征^[13]。因此,本研究将利用上述模型,进一步探讨

乌梅丸加减治疗对结肠炎小鼠 Th17/Treg 平衡和菌群结构的调控作用,为中医药临床治疗及微生态治疗策略开发提供更多的研究思路和参考依据。

1 材料

1.1 动物 雄性, SPF 级, 6~8 周龄, 体质量 18~20 g, C57BL/6 小鼠, 购于北京斯贝福实验动物技术有限公司, 合格证号 SCXK(京)2019-0010。饲养于北京中医药大学动物房, 恒温恒湿, 可自由获得辐照食物和高压灭菌水。并在 25 °C 的 SPF 条件下维持 12 h 的明暗循环。该动物实验经北京中医药大学伦理委员会批准(BUCM-4-2021092705-3163)。

1.2 药物 乌梅丸加减颗粒由乌梅 12 g(批号 0322003861)、黄连 5 g(批号 0422000141)、黄柏 10 g(批号 0422003371)、细辛 3 g(批号 124003801)、花椒 6 g(批号 24017303)、炮姜 9 g(批号 22041441)、桂枝 10 g(批号 24000081)、制附片 10 g(批号 22044914)、木香 6 g(批号 24010041)、苦参 9 g(批号 0422006591)、青黛 3 g(批号 90723003)、三七 6 g(批号 2108034)、地榆炭 15 g(批号 22009261)、白头翁 15 g(批号 24006071)、秦皮 10 g(批号 22040351)、炙甘草 6 g(批号 24018961)组方, 经北京中医药大学东方医院配方颗粒药房根据饮片颗粒转换标准换算提供。

1.3 试剂 甲硝唑、万古霉素、青霉素(美国 Sigma 公司, 货号分别为 M1547-5G、V2002-5G、A9518-25G-9); 新霉素(美国 Inalco 公司, 货号 1758-9326); 鼠抗 CD16/32、鼠抗 CD3 ϵ 、鼠抗 CD4、鼠抗维甲酸受体相关孤儿受体 γ (ROR γ)、鼠抗叉头框蛋白 P3(FoxP3)抗体(美国 Biolegend 公司, 货号分别为 101302、100303、100403、100303、100403); III 胶原(Col III, 美国 Worthington 公司, 货号 LS004183); Percoll 分离液(美国 GE Healthcare 公司, 货号 17-0891-09); 苏木素-伊红(HE)染色液(中国 Servicebio 公司, 批号 CR2410015)。

1.4 仪器 Aperio Versa 型超分辨显微组织成像显微镜(德国 Lecia 公司); CytoFLEX 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司); 5415 型高速离心机(德国 Eppendorf 公司); YXQ-LS-100A 型高压灭菌锅(美国 Leaf Tach 公司); ME204/02 型精密天平(中国 Mettler Toledo 公司)。

2 方法

2.1 药物制备 乌梅丸加减: 取颗粒剂用灭菌水 33.4 mL 溶解, 37 °C 水浴锅加热至含药物质量浓度为 2 g·mL⁻¹, 后用 1.5 mL 离心管分装, 存放于 -20 °C

冰箱, 使用时 37 °C 加热并通过高压及紫外灭菌^[14]。

2.2 UC 患者粪便菌悬液的制备 收集的粪便标本来源于前期临床研究中纳入的湿热瘀阻证 UC 进展期患者^[11], 并按照 1:10 的比例稀释 UC 患者粪便。将 10~15 例 UC 患者粪便放于 100 mL 无菌玻璃瓶中均匀混合, 获取混合粪便 10 g, 加入含 15% 甘油的无菌 PBS 100 mL, 涡旋混合均匀, 过 100 μ m 的筛网, 转移至新的 50 mL 离心管, 取全部滤液分装至 1.5 mL 离心管, 每管 1.4 mL, 全部分装, 封口膜封口, 液氮速冻后置于 -80 °C 保存待用^[14](超净台操作)。

2.3 菌群人源化小鼠模型构建 选取雄性 6~8 周龄 C57BL/6J 小鼠, 适应 7 d 后, 给予含四环抗生素(万古霉素 0.1 g·kg⁻¹、硫酸新霉素 0.2 g·kg⁻¹、氨苄青霉素 0.2 g·kg⁻¹、甲硝唑 0.2 g·kg⁻¹), 每只按 0.2 mL·d⁻¹ 灌胃, 持续 21 d^[15]。抗生素清菌结束后, 开始灌胃 UC 患者粪便菌悬液, 灌胃剂量每只 0.2 mL·d⁻¹, 连续灌胃 19 d, 以此获得 UC 菌群人源化小鼠模型^[13], 根据湿热证动物模型症状评价研究^[16], 若出现饮水次数增加, 蜷缩, 卷毛, 大便溏软, 肛门污浊, 小便短少色黄, 则提示湿热瘀阻证模型制备成功。

2.4 动物分组及给药 按随机数法将小鼠分为 3 组, 每组 8 只, 分别为正常组、模型组、乌梅丸加减组。以人(60 kg)临床剂量为乌梅丸加减组标准剂量, 根据人与动物体表面积换算小鼠的用药剂量为人用剂量的 9 倍, 得出以下给药剂量。乌梅丸加减组每日灌胃 12.5 mL·kg⁻¹ 药液^[14], 正常组和模型组灌胃等量无菌水。连续灌胃 7 d 后取材。

2.5 HE 染色观察结肠组织病理损伤 实验结束后, 取小鼠结肠约 1 cm, 于 4% 多聚甲醛固定。经脱水、包埋、切片、HE 染色, 中性树脂封片后烘干。光镜下观察切片组织形态学变化。

2.6 结肠黏膜固有层单细胞悬液的制备 提取小鼠结肠组织并剪块, 用含 EDTA 的 D-Hank's 洗涤后, 经 Col III 的 RPMI 1640 溶液 37 °C 消化 60 min, 并通过 70 μ m 的细胞筛过滤, 离心收集细胞沉淀, 再经冷 PBS 洗涤 2 次后, 重悬于 40% Percoll 分离液中进行梯度离心, 沉淀细胞用红细胞裂解液裂解, 冷 PBS 洗涤 2 次, 重悬于含 0.5% BSA 的 PBS 溶液中计数, 并取 1 \times 10⁶ 个细胞用于后续流式细胞术检测。

2.7 流式细胞术检测 单细胞悬液(1 \times 10⁶ 个细胞)在 RPMI1640 培养基(含 10% 胎牛血清、1% 双抗、0.2% 细胞刺激剂)中 37 °C 培养 6 h, 经 CD3/CD4 抗体标记、破膜固定及 ROR γ t/FoxP3 抗体孵育后, 用

含0.5% BSA的PBS洗涤,上机检测。以CD3⁺CD4⁺RORγt⁺界定为Th17细胞,CD3⁺CD4⁺FoxP3⁺界定为Treg细胞。

2.8 16S rRNA测序分析 收集各组小鼠的新鲜粪便于-80℃下保存,提取粪便总DNA,送生物公司进行16S rRNA测序。使用Illumina Miseq平台进行16S rRNA高通量测序,使用QIIME2.0平台进行序列组装、序列抽平、质量控制、物种分类学注释、α多样性指数分析、主坐标分析(PCoA)等基础分析。使用Graph Pad Prism 计算并绘制α多样性中和β多样性相关指数图。利用线性判别分析(LEfSe)对样本肠道菌群丰度进行组间差异评估,其中Wilcoxon秩和检验的显著性阈值设定为0.05,以识别具有显著差异的菌群。线性判别分析(LDA)计算优势菌群的LDA得分,筛选出优势菌种,筛选阈值设定为2,比较各组小鼠之间的关键差异物种。

2.9 统计学分析 应用Graph Pad Prism 7.0软件进行数据分析。符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用非配对t检验。不符合正态分布的组内比较采用Wilcoxon秩和检验,相关性分析采用Spearman秩相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 乌梅丸加减对湿热瘀阻证UC菌群人源化小鼠结肠长度与脾脏指数的影响 与正常组比较,模型组小鼠小鼠结肠长度明显缩短($P < 0.05$),而脾脏指数显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,乌梅丸加减组小鼠的结肠长度明显增加($P < 0.05$),脾脏指数显著降低($P < 0.01$)。见表1。

表1 乌梅丸加减对湿热瘀阻证UC菌群人源化小鼠结肠长度与脾脏指数的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

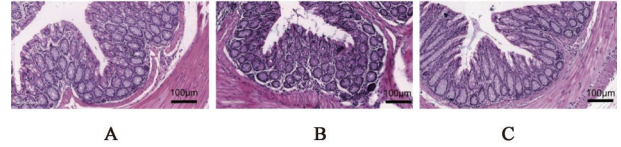
Table 1 Effect of modified Wumeiwan on length of colon and spleen index of UC with dampness-heat obstruction syndrome in human flora-associated model ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	结肠长度/cm	脾脏指数
正常组		8.54±0.98	0.23±0.02
模型组		7.08±0.17 ¹⁾	0.39±0.08 ²⁾
乌梅丸加减组	25	7.62±0.79 ³⁾	0.26±0.05 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表2同)

3.2 乌梅丸加减对湿热瘀阻证UC菌群人源化小鼠结肠组织病理学影响 光镜下正常组小鼠结肠结构清晰紧密,无明显充血、水肿及炎性细胞浸润,杯状细胞完整,腺体分布均匀,而模型组小鼠出现了

一定程度的炎细胞浸润、杯状细胞紊乱。与模型组比较,乌梅丸加减干预后,炎症细胞浸润程度有一定改善,小鼠腺体、杯状细胞部分得到恢复。见图1。



注:A.正常组;B.模型组;C.乌梅丸加减组

图1 乌梅丸加减对湿热瘀阻证UC菌群人源化小鼠结肠组织变化的影响(HE,×100)

Fig. 1 Effect of modified Wumeiwan on colon tissue in UC with dampness-heat obstruction syndrome in human flora-associated model (HE,×100)

3.3 乌梅丸加减对湿热瘀阻证UC菌群人源化小鼠结肠Th17/Treg细胞比例影响 流式细胞术结果显示,与正常组比较,模型组小鼠结肠组织黏膜固有层Th17细胞比例显著增加($P < 0.01$),Treg细胞比例显著降低($P < 0.01$),且Th17/Treg的比例显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,乌梅丸加减组Th17细胞明显降低($P < 0.01$),而Treg细胞的比例显著增加($P < 0.01$),同时Th17/Treg的比例也显著降低($P < 0.01$)。见表2及增强出版附加材料。

表2 乌梅丸加减对湿热瘀阻证UC菌群人源化小鼠Th17/Treg的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effect of modified Wumeiwan on Th17/Treg cells of colons in UC with dampness-heat obstruction syndrome in human flora-associated model ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Th17/%	Treg/%	Th17/Treg
正常组		2.36±0.30	9.19±0.15	0.27±0.04
模型组		9.46±0.28 ²⁾	6.55±0.68 ²⁾	1.46±0.13 ²⁾
乌梅丸加减组	25	7.89±0.81 ⁴⁾	8.97±0.78 ⁴⁾	0.88±0.05 ⁴⁾

3.4 乌梅丸加减对湿热瘀阻证UC菌群人源化小鼠肠道微生物群组成和结构的影响

3.4.1 肠道菌群多样性分析 用Chao1算法估计样品中所含操作分类单元(OTU)数目,其常用来评估样本中OTU数目多少,能反映出样品的菌群丰富度。样品的Chao 1指数的数值越大,说明该样品所含OTU数目越多,样品物种数较多。Shannon指数则是用来估算样品中微生物的多样性的指数,Shannon值越大,说明群落丰富度和均匀度越高。在属水平上,对各组小鼠肠道菌群α多样性指数(Chao、Shannon指数)的大小和组间差异进行统计分析。乌梅丸加减的Chao、Shannon指数显著小于

模型组($P<0.01$)(增强出版附加材料)。在 β 多样性中,通过PCoA分析对比各组样本菌群结果的差异,结果表明乌梅丸加减给药后对UC人源化菌群小鼠肠道菌群变化产生了扰动作用(增强出版附加材料)。

3.4.2 物种组成分析及差异分析 群落组成分析还揭示了不同群体之间微生物群落的显著变化。选取 Top10 物种展示其在门、属水平上各样本的物种组成的丰度,其中乌梅丸加减组正向调控厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、梭杆菌门(Fusobacteriota)、放线菌门(Actinobacteriota)、芽单胞菌门(Gemmatimonadota)等的丰度,促进拟杆菌属(*Bacteroides*)、拟普雷沃氏菌属(*Alloprevotella*)、巴氏杆菌属(*Pasteurella*)、梭杆菌

属(*Fusobacterium*)等的定植。随后,使用LefSe分析找出对样品产生显著性差异影响的群落或物种,物种的线性判别分析(LDA)值用横坐标表示,设置差异物种判别阈值 $LDA>2$,筛选出有显著差异的菌属,发现与模型组比较,乌梅丸加减治疗组中拟杆菌属丰度升高最为显著。见增强出版附加材料。

3.4.3 差异菌种与免疫细胞 Spearman 相关性分析 进一步筛选有显著差异的菌种,发现其多形拟杆菌(*Bacteroides thetaiotaomicron*)、脆弱拟杆菌(*B. fragilis*)、卵形拟杆菌(*B. ovafus*)较模型组显著升高,见表3。其中*B. thetaiotaomicron*、*B. fragilis*、艰难梭状芽胞杆菌(*Clostridioides difficile*)、无丙二酸柠檬酸杆菌(*Citrobacter amalonaticus*)相对丰度与Th17水平呈负相关($P<0.05$, $P<0.01$),见图2A。

表3 乌梅丸加减对湿热瘀阻证UC菌群人源化小鼠差异拟杆菌种影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Effect of modified Wumeiwan on differential *Bacteroides* species in UC with dampness-heat obstruction syndrome in human flora-associated model ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Bacteroides ovafus</i>
模型组		0.10±0.05	0.01±0.01	0.03±0.03
乌梅丸加减组	25	0.40±0.28 ¹⁾	0.07±0.03 ²⁾	0.10±0.02 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$

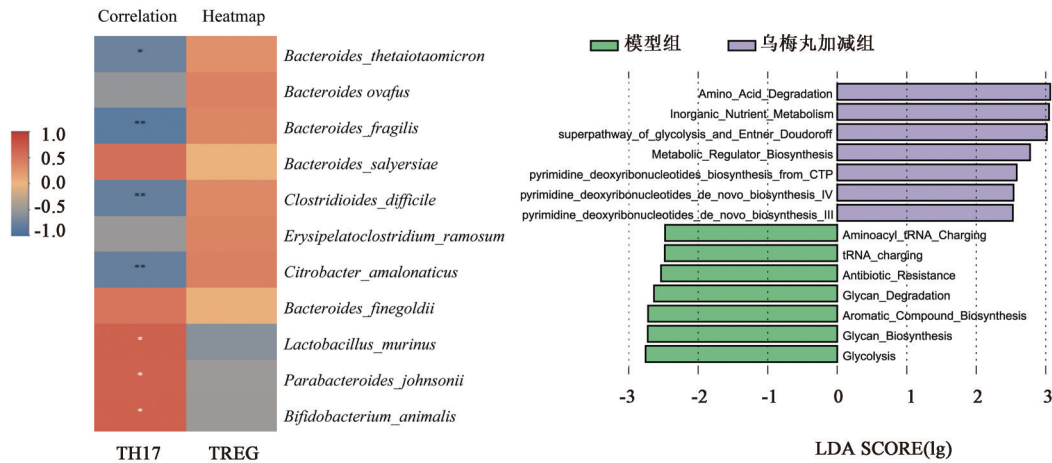


图2 湿热瘀阻证UC菌群人源化小鼠肠道差异菌种与免疫细胞相关性分析及菌群功能预测

Fig. 2 Analysis of correlation between intestinal differential bacteria and immune cells and prediction of gut microbiota function in UC with dampness-heat obstruction syndrome in human flora-associated model

3.4.4 肠道菌群功能预测 根据物种注释和OTU丰度信息,以MetaCyc数据库作为注释,使用PICRUST2软件对各组小鼠肠道菌群进行基因功能预测(图2B),发现其代谢通路主要有:氨基酸降解(amino acid degradation)、无机营养素代谢(inorganic nutrient;metabolism)、糖酵解的超通路及ed途径(superpathway of glycolysis and Entner Doudoroff)、代谢调节剂-生物合成嘧啶(metabolic

regulator Biosynthesis),由CTP生物合成嘧啶脱氧核糖核苷酸(pyrimidine deoxyribonucleotides biosynthesis from CTP),从头合成嘧啶脱氧核糖核苷酸第四阶段(pyrimidine deoxyribonucleotides de novo biosynthesis IV),从头合成嘧啶脱氧核糖核苷酸第三阶段(pyrimidine deoxyribonucleotides : de novo biosynthesis III)。氨酰基 tRNA 转接(aminoacyl tRNA charging),抗生素耐药性

(antibiotic resistance) 多聚糖降解 (glycan degradation) 等,其中糖代谢^[17]、核苷酸代谢^[18]和UC病变进程密切相关,其相关通路紊乱可导致小鼠肠道菌群及免疫失调。

4 讨论

UC 中医归属“痢疾”“泄泻”“肠癖”等范畴,病位在大肠,发病与肝、脾密切相关,病机属虚实夹杂,以脾胃虚弱为本,湿毒内蕴为标,乌梅丸为治疗久泻、久痢的常用方,诸药功善寒温并用、清补兼施,临床用于UC疗效确切^[19]。由于小鼠与人类在解剖和生理上的差异,常见的由葡聚糖硫酸钠及化学药物所构建的UC模型可能无法充分模拟人源化菌群的影响。因此,本研究通过FMT构建湿热瘀阻证UC菌群人源化小鼠模型,并使用UC临床常用方乌梅丸加减进行治疗。结果显示模型组出现了蜷缩,卷毛,大便溏软,肛门污浊,小便短少色黄诸证。乌梅丸加减治疗后缓解了FMT的湿热瘀阻证UC菌群人源化小鼠结肠炎症状,相较于模型组,脾指数降低,结肠长度增加,结肠病理损伤减轻。

Th17细胞可以通过分泌的IL-17动员募集及活化中性粒细胞介导炎症反应,被认为是UC的主要致病因素^[20]。而Treg细胞可以在炎症部位活化增殖来发挥抗炎作用,Th17/Treg平衡可作为免疫性疾病UC发生发展重要指标。临床研究发现乌梅丸可以促进UC患者CD3⁺、CD4⁺T淋巴细胞功能及分化,降低炎症反应从而改善临床症状^[21]。本研究结果证实乌梅丸加减能通过减少UC菌群人源化小鼠肠道Th17细胞,调节Th17/Treg细胞比例失衡,减少肠道炎症的发生,进而对UC小鼠发挥治疗作用。

既往研究指出肠道菌群在新陈代谢和免疫系统的发育和功能方面对于宿主具有重要的调控作用^[22]。具体而言,细菌对肠道炎症有触发作用^[23-24]。而本实验 α 多样性分析显示乌梅丸加减治疗的UC小鼠肠道菌群的丰度和多样性低于模型组,Chao1是度量物种丰富度的指标,其与物种丰度、均匀度无关,但是其对稀有的物种很敏感,由此可推断人源粪菌移植引起小鼠肠道菌群的紊乱,可能是由于大量正常状态下不活跃的菌开始定植、生长,包括大量致病菌。此外,已有研究表明UC的微生物群的组成发生了变化^[25],而不同证候的UC患者肠道菌群具有一定的特异性^[26]。人类胃肠道的细菌主要从属于四大门类:厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门和放线菌门,其中厚壁菌门和拟杆菌门约占占比80%~90%^[27],基于高通量测序技术研究发现,大肠

湿热证UC患者肠道中,*Bacteroides*显著降低^[28]。而内生湿热证人群主要表现在拟杆菌门/厚壁菌门相对丰度比值下调^[29]。更有研究显示湿热证减分率和*Bacteroides*含量呈负相关,从而认为*Bacteroides*可作为治疗湿热证疗效观察的标志物之一^[30]。与乌梅丸加减组比较,模型组*Bacteroides*丰度明显降低,较好地模拟了湿热证UC患者主要标志菌群结构的变化特征。

经过乌梅丸加减治疗组小鼠的肠道微生物群中,*Bacteroides*的丰度显著增加。特别是*B. thetaiotaomicron*、*B. fragilis*和*B. ovafus*丰度较模型组显著增加,其中多形拟杆菌与脆弱拟杆菌丰度与Th17细胞的比例呈现出负相关性。目前研究发现*Bacteroides*与UC的免疫调控直接相关^[31],能够诱导CD4⁺肠上皮内淋巴细胞的抗原特异性分化进而调控肠道免疫^[32]。*B. thetaiotaomicron*丰度增加可以减少促炎细胞因子[如Toll样受体4(TLR4)和核转录因子- κ B(NF- κ B)]的释放从而改善肠道炎症^[33]。而*B. fragilis*定植已被证明可有效改善由慢性炎症引起的肠上皮损伤并预防结肠肿瘤的发展^[34],并可以通过转化生长因子- β (TGF- β)/Smad3通路诱导Treg细胞分化缓解结肠炎^[35]。而*B. ovafus*产生的吡啶-3-乙酸促进免疫细胞产生IL-22,对结肠炎产生有益作用^[36]。此外,治疗组小鼠中肠道菌群的主要功能为糖酵解、氨基酸代谢、多聚糖降解等新陈代谢。而拟杆菌属菌20%基因组用于复杂多糖的摄取和分解,并调控其加工过程,这些基因集中于特定区域形成多糖利用位点(PUL),其中14对PUL相关位点在多形拟杆菌、脆弱拟杆菌、卵形拟杆菌等其他拟杆菌属中均有发现,他们在调控宿主细胞糖代谢方面发挥着重要作用^[37]。研究证实随着葡萄糖浓度上升,Treg和Th2比例增高,Th1和Th17细胞比例则降低^[38],Treg细胞分化时上调葡萄糖转运蛋白,增加葡萄糖摄取和消耗^[39]。菌群多糖代谢-葡萄糖-免疫细胞糖酵解途径可能是微生物功能变化调控免疫细胞分化的另一种方式,进而调节宿主的免疫炎症反应^[39]。表明乌梅丸加减可能主要通过促进拟杆菌属中的有益菌丰度,直接调控Th17/Treg免疫细胞比例及功能从而发挥对结肠炎的治疗作用,另一方面糖代谢途径将肠道拟杆菌功能与免疫细胞的分化联系起来,通过调节肠道菌群糖代谢功能,为间接调节免疫反应提供新的治疗策略。

综上所述,本实验通过FMT构建湿热瘀阻证

UC菌群人源化小鼠模型,并在此基础上,对乌梅丸加减的疗效进行了系统性评估。湿热证UC的主要肠道菌群结构主要聚焦于拟杆菌的变化,乌梅丸加减可增加多形拟杆菌、脆弱拟杆菌、卵形拟杆菌等有益菌丰度,恢复正常肠道菌群结构,并通过菌群多糖代谢功能进一步调节免疫细胞糖酵解途径,进而改善Th17/Treg细胞比例失衡来发挥抗炎作用,从而治疗UC。肠道微生物学与中医理论存在很多相似之处。深入研究湿热证与肠道微生态的关系可以赋予中医证候学说新的微生物学内涵,也可以为中医药的现代化研究和临床应用提供新的思路。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] NG S C, SHI H Y, HAMIDI N, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: A systematic review of population-based studies[J]. *Lancet*, 2017, 390 (10114): 2769-2778.

[2] LIU Y J, TANG B, WANG F C, et al. Parthenolide ameliorates colon inflammation through regulating Treg/Th17 balance in a gut microbiota-dependent manner [J]. *Theranostics*, 2020, 10(12): 5225-5241.

[3] CLEMENTE J C, MANASSON J, SCHER J U. The role of the gut microbiome in systemic inflammatory disease [J]. *BMJ*, 2018, 360: j5145.

[4] 智慧, 龙健, 刘可云. 溃疡性结肠炎中西医结合治疗研究进展 [J]. *现代医药卫生*, 2023, 39(8): 1366-1369.

ZHI H, LONG J, LIU K Y, et al. Research progress of traditional Chinese and western medicine treatment of ulcerative colitis [J]. *J Mod Med Health*, 2023, 39 (8) : 1366-1369.

[5] 王辰, 曹小宇, 李亚兰, 等. 中医药治疗炎症性肠病的用药时期演进规律 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, doi: 10. 13422/j. cnki. syfjx. 20250935.

WANG C, CAO X Y, LI Y L. et al. Evolution of medication patterns in traditional Chinese medicine for treating inflammatory bowel disease [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2025, doi: 10. 13422/j. cnki. syfjx. 20250935.

[6] 李亚兰, 张崇豪, 刘华琛, 等. 干姜通过TLR4/MAPK信号通路调控Ly6Chi单核/巨噬细胞改善炎症性肠病的作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, doi: 10. 13422/j. cnki. syfjx. 20242435.

LI Y L, ZHANG C H, LIU H C. et al. Zingiberis Rhizoma alleviates inflammatory bowel disease through regulating TLR4/MAPK signaling pathway in Ly6Chi monocytes/macrophages [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2025, doi: 10. 13422/j. cnki. syfjx. 20242435.

[7] 刘华琛, 张崇豪, 李亚兰, 等. 乌梅通过MEK/ERK信号通路修复IBD小鼠肠黏膜上皮屏障功能 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, doi: 10. 13422/j. cnki. syfjx. 20250540.

LIU H C, ZHANG C H, LI Y L. et al. Mume Fructus restores intestinal mucosal epithelial barrier through MEK/ERK signaling pathway in mouse model of inflammatory bowel

disease [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2025, doi: 10. 13422/j. cnki. syfjx. 20250540.

[8] 邓雨清, 李军祥, 毛堂友, 等. 李军祥教授运用新乌梅丸治疗慢性复发型溃疡性结肠炎的经验 [J]. *中国医药导报*, 2023, 20(34): 154-156.

DENG Y Q, LI J X, MAO T Y, et al. Professor LI Junxiang's experience in treating chronic recurrent ulcerative colitis with new Wumeiwans [J]. *Chin Med Her*, 2023, 20(34): 154-156.

[9] ZHU Z, KAISER T, STALEY C. Antibiotic conditioning and single gavage allows stable engraftment of human microbiota in mice [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2327: 281-291.

[10] XIAN W, YANG S, DENG Y, et al. Potential of establishing the corresponding human microbial community in pseudo germ-free mice through fecal microbe transfer from three urolithin metabolotypes [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70 (30): 9388-9398.

[11] PARK J C, IM S H. Of men in mice: The development and application of a humanized gnotobiotic mouse model for microbiome therapeutics [J]. *Exp Mol Med*, 2020, 52 (9) : 1383-1396.

[12] 李毅, 樊新荣, 刘力, 等. 基于因子分析与聚类分析对溃疡性结肠炎中医证候规律的研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2017, 37(10): 1191-1195.

LI Y, FAN X R, LIU L, et al. Study on the Chinese medical syndrome types of ulcerative colitis based on factor analysis and cluster analysis [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2017, 37(10): 1191-1195.

[13] LI N, MA P, LI Y, et al. Gut microbiota-derived 12-ketolithocholic acid suppresses the IL-17A secretion from colonic group 3 innate lymphoid cells to prevent the acute exacerbation of ulcerative colitis [J]. *Gut Microbes*, 2023, 15 (2): 2290315.

[14] 李新, 俞赞丰, 上官雪丽. 基于HGF/C-Met信号通路探讨乌梅丸对寒热错杂证Lewis肺癌小鼠的抑癌作用及机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(21): 32-41.

LI X, YU Y F, SHANGGUAN X L. Based on the HGF/C-Met signaling pathway, the anti-tumor effect and mechanism of Wumeiwan on Lewis lung cancer mice with cold-heat mixed syndrome were investigated [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2022, 28 (21): 32-41.

[15] ZHANG S L, MAO Y Q, ZHANG Z Y, et al. Pectin supplement significantly enhanced the anti-PD-1 efficacy in tumor-bearing mice humanized with gut microbiota from patients with colorectal cancer [J]. *Theranostics*, 2021, 11 (9): 4155-4170.

[16] 李威莹, 吴威, 孟岩, 等. 湿热证动物模型造模方法及评价研究 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2021, 23(12): 4441-4451.

LI W Y, WU W, MENG Y, et al. Study on modeling method and evaluation of animal model of damp-heat syndrome [J]. *World Sci Technol-Mod Tradit Chin Med*, 2021, 23 (12) : 4441-4451.

[17] LI D, YANG Y, YIN X, et al. Glucagon-like peptide (GLP)-2 improved colonizing bacteria and reduced severity of ulcerative colitis by enhancing the diversity and abundance of intestinal mucosa [J]. *Bioengineered*, 2021, 12 (1) : 5195-

- 5209.
- [18] ZHOU X, GOU K, XU J, et al. Discovery and optimization of novel hDHODH inhibitors for the treatment of inflammatory bowel disease[J]. *J Med Chem*, 2023, 66 (21): 14755-14786.
- [19] 谭俊, 黄贵华, 林壮燕, 等. 乌梅丸治疗溃疡性结肠炎的临床及实验研究进展[J]. *现代医学与健康研究电子杂志*, 2022, 6(3):131-134.
TAN J, HUANG G H, LIN Z Y, et al. Clinical and experimental research progress of Wumeiwans in the treatment of ulcerative colitis [J]. *Electronic J Mod Med Health Res*, 2022, 6 (3): 131-134.
- [20] WAN Z, ZHOU Z, LIU Y, et al. Regulatory T cells and T helper 17 cells in viral infection[J]. *Scand J Immunol*, 2020, 91(5): E12873.
- [21] 黄亮, 区坚辉, 陈婷婷, 等. 乌梅丸治疗溃疡性结肠炎对患者T淋巴细胞的影响观察[J]. *智慧健康*, 2023, 9(30): 23-26.
HUANG L, QU J H, CHEN T T, et al. Effect of Wumeiwans on t lymphocytes in patients with ulcerative colitis[J]. *Smart Healthcare*, 2023, 9(30): 23-26
- [22] 吴婧, 高宗跃, 周晓丽, 等. 中医药调节肠道菌群防治溃疡性结肠炎的研究进展[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2024, 32(3):260-264.
WU J, GAO Z Y, ZHOU X L, et al. Research advances on regulation of intestinal flora by traditional Chinese medicine in prevention and treatment of ulcerative colitis[J]. *Chin J Integr Tradit West Med Dig*, 2024, 32(3): 260-264.
- [23] LEE M, CHANG E B. Inflammatory bowel diseases (IBD) and the microbiome-searching the crime scene for clues[J]. *Gastroenterology*, 2021, 160 (2):524-537.
- [24] JERGENS A E, PARVINROO S, KOPPER J, et al. Rules of engagement: Epithelial-microbe interactions and inflammatory bowel disease [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 8:669913.
- [25] LAVELLE A, SOKOL H. Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17 (4):223-237.
- [26] 张玉雯, 王佳佳, 巴寅颖, 等. 中医药调节溃疡性结肠炎常见证候肠道菌群的研究进展[J]. *世界中医药*, 2022, 17(20): 2953-2958.
ZHANG Y W, WANG J J, BA Y Y, et al. Research progress on traditional Chinese medicine in regulating intestinal flora in ulcerative colitis of common syndromes [J]. *World Chin Med*, 2022, 17(20): 2953-2958.
- [27] 赵佳, 向雪松. 生命不同阶段肠道菌群变化及其影响因素[J]. *卫生研究*, 2020, 49(1):155-159.
ZHAO J, XIANG X S. The changes of intestinal flora and its influencing factors at different stages of life[J]. *Health Res*, 2020, 49 (1):155-159
- [28] 王灿, 张心怡, 金黑鹰, 等. 内生湿热证人群的肠道菌群特点研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2021, 30(1):38-43.
WANG C, ZHANG X Y, JIN H Y, et al. Study on the characteristics of intestinal flora in the population with endogenous damp-heat syndrome [J]. *Mod J Integr Tradit Chin Wes Med*, 2021, 30(1): 38-43.
- [29] 丁庞华, 李军祥, 郭一, 等. 基于高通量测序技术的溃疡性结肠炎大肠湿热证患者肠道菌群多样性的研究[J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2018, 20(6):967-973.
DING P H, LI J X, GUO Y, et al. Study on the diversity of intestinal flora in patients with ulcerative colitis with large intestine damp-heat syndrome based on high-throughput sequencing technology [J]. *World Sci Technol-Mod Tradit Chin Med*, 2018, 20 (6): 967-973.
- [30] 吴巧玲, 贺怡宁, 赵崧. 湿热证与肠道微生物相关性的研究进展[J]. *江西中医药*, 2022, 53(6):63-66.
WU Q L, HE Y N, ZHAO S. Research progress on the correlation between dampness heat syndrome and intestinal microorganisms [J]. *Jiangxi J Tradit Chin Med*, 2022, 53 (6): 63-66.
- [31] NOMURA K, ISHIKAWA D, OKAHARA K, et al. Bacteroidetes species are correlated with disease activity in ulcerative colitis[J]. *J Clin Med*, 2021, 10 (8):1749.
- [32] BOUSBAIN D, FISCH L I, LONDON M, et al. A conserved Bacteroidetes antigen induces anti-inflammatory intestinal T lymphocytes [J]. *Science*, 2022, 377 (6606): 660-666.
- [33] ZOU L E, YANG Y N, ZHAN J, et al. Gut microbiota-based discovery of Houttuyniae Herba as a novel prebiotic of *Bacteroides thetaiotaomicron* with anti-colitis activity [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 172:116302.
- [34] SHAO X, SUN S, ZHOU Y, et al. *Bacteroides fragilis* restricts colitis-associated cancer via negative regulation of the NLRP3 axis[J]. *Cancer Lett*, 2021, 523:170-181.
- [35] 魏芳, 范梦慧, 刘光臣, 等. 脆弱拟杆菌 ATCC25285 通过 TGF- β /Smad3 通路诱导 Treg 细胞分化缓解结肠炎[J]. *中国药科大学学报*, 2023, 54(2):226-237.
WEI F, FAN M H, LIU G C, et al. *Bacteroides fragilis* ATCC25285 relieves colitis by inducing Treg cells differentiation via the TGF- β /Smad3 signaling pathway[J]. *J Chin Pharm Univ*, 2023, 54(2): 226-237.
- [36] IHEKWEAZU F D, ENGEVIK M A, RUAN W, et al. *Bacteroides ovatus* promotes IL-22 production and reduces trinitrobenzene sulfonic acid-driven colonic inflammation[J]. *Am J Pathol*, 2021, 191 (4):704-719.
- [37] SCHWALM N D, GROISMAN E A. Navigating the gut buffet: Control of polysaccharide utilization in *Bacteroides* spp [J]. *Trends Microbiol*, 2017, 25 (12):1005-1015.
- [38] 陈冬平, 伍宁波, 苏冰, 等. 葡萄糖对小鼠 CD4⁺T 细胞分化的影响和机制初探[J]. *上海交通大学学报:医学版*, 2019, 39(8):820.
CHEN D P, WU N B, SU B, et al. The effect and mechanism of glucose on the differentiation of mouse CD4⁺T cells[J]. *J Shanghai Jiao Tong Univ Med Sci*, 2019, 39 (8): 820.
- [39] ALMEIDA L, DHILLON-LABROOY A, CARRICHE G, et al. CD4⁺T-cell differentiation and function: Unifying glycolysis, fatty acid oxidation, polyamines NAD mitochondria [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2021, 148 (1): 16-32.

[责任编辑 孙丛丛]