

基于肠道菌群及肠黏膜屏障功能探索百药煎治疗 溃疡性结肠炎的作用机制

王瑞生, 张振凌*, 曹文文, 陈祎甜, 张江山

(河南中医药大学 河南省中药特色炮制技术工程研究中心,
呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 郑州 450008)

[摘要] **目的:**比较百药煎发酵炮制前后对溃疡性结肠炎(UC)小鼠肠道菌群及肠黏膜中闭合蛋白(Occludin)和闭锁小带蛋白-1(ZO-1)表达的影响,探讨五倍子和百药煎治疗UC的作用机制,指导中医临床区别用药。**方法:**将50只小鼠随机分为5组,每组10只,随机选取1组为空白组,其余4组采用右旋葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导UC模型;造模完成后,空白组和模型组给予生理盐水,给药组分别给予美沙拉嗪($0.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),五倍子水煎液($1.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和百药煎水煎液($2.7\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)灌胃7 d;运用16S rRNA测序技术检测小鼠粪便肠道菌群的变化,苏木精-伊红(HE)染色观察结肠组织病理学变化,免疫组化对比小鼠结肠组织Occludin和ZO-1的表达。**结果:**UC小鼠肠道菌群丰度、多样性较空白组均明显降低,结肠组织充血增厚,出现明显溃疡,Occludin和ZO-1的表达量显著降低($P<0.01$)。经五倍子和百药煎治疗后,菌群丰度及多样性均有提升,门水平主要表现为五倍子组厚壁菌门、变形菌门和放线菌门相对丰度显著增加($P<0.01$),拟杆菌门丰度显著减少($P<0.01$);百药煎组变形菌门和放线菌门相对丰度显著增加($P<0.01$),厚壁菌门相对丰度增加和拟杆菌门相对丰度减少,但差异均无统计学意义。属水平主要表现为五倍子组拟杆菌属、瘤胃球菌属和Allobaculum相对丰度显著降低($P<0.01$),罗斯氏菌属、普雷沃菌属、颤螺旋菌属和帕拉普氏菌属相对丰度明显升高($P<0.05, P<0.01$);百药煎组拟杆菌属和Allobaculum相对丰度明显降低($P<0.05, P<0.01$),普雷沃菌属、颤螺旋菌属、罗斯氏菌属和瘤胃球菌属相对丰度显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,五倍子组和百药煎组结肠组织均明显恢复,充血减轻,仅见散在溃疡;Occludin和ZO-1的表达量升高,且百药煎组的表达量高于五倍子组。**结论:**百药煎治疗UC效果优于五倍子,其机制可能为通过调节肠道菌群的相对丰度和多样性,改善肠道菌群紊乱状况,提高ZO-1和Occludin的表达,保护肠道黏膜屏障功能,起到减轻肠道炎症的作用。

[关键词] 五倍子; 百药煎; 溃疡性结肠炎; 肠道菌群; 16S rRNA高通量测序; 肠道黏膜屏障; 紧密连接

[中图分类号] R22;R378.2;R28;R574.62 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)20-0046-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211347 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210401.0942.002.html>

[网络出版日期] 2021-04-01 10:12

Analysis on Mechanism of Baiyaojian in Treating Ulcerative Colitis Based on Intestinal Flora and Intestinal Mucosal Barrier Function

WANG Rui-sheng, ZHANG Zhen-ling*, CAO Wen-wen, CHEN Yi-tian, ZHANG Jiang-shan
(Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases Co-constructed by
Henan Province & Ministry of Education, Henan Engineering Research Center for Special Processing
Technology of Chinese Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the effects of Baiyaojian before and after fermentation on intestinal flora and expression of Occludin and zonula occludens protein-1 (ZO-1) in intestinal mucosa of mice with ulcerative colitis (UC), and to explore the mechanism of Baiyaojian and Galla Chinensis in the treatment of UC.

[收稿日期] 20210112(012)

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2018YFC1707200);河南中医药大学博士基金项目(RSBSJJ2019-09)

[第一作者] 王瑞生, 讲师, 从事中药饮片质量及炮制作用机制研究, Tel: 0371-65676656, E-mail: wrsh900226@163.com

[通信作者] *张振凌, 教授, 从事中药饮片质量及炮制作用机制研究, Tel: 0371-65676656, E-mail: zhangz16758@163.com

Method: Totally 50 mice were randomly divided into 5 groups with 10 mice in each group, one group was randomly selected as blank group, and the other 4 groups were treated with dextran sodium sulfate (DSS) to induce UC model. After modeling, mice in the blank group and model group were given normal saline, and treatment groups were given Mesalazine ($0.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), Galla Chinensis decoction ($1.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and Baiyaojian decoction ($2.7 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) by intragastric administration for 7 days. The 16S rRNA sequencing technology was used to detect the changes of intestinal flora in mouse feces. The histopathological changes of colon tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, and the expression of Occludin and ZO-1 in colon tissue of mice were compared by immunohistochemistry. **Result:** Compared with the blank group, the abundance and diversity of intestinal flora in UC mice were significantly decreased, and the colonic tissue was thickened with congestion and obvious ulcers, and the expression levels of Occludin and ZO-1 were significantly decreased ($P<0.01$). After treatment with Galla Chinensis and Baiyaojian, the abundance and diversity of flora were improved. At the phylum level, relative abundance of Firmicutes, Proteobacteria and Actinobacteria increased significantly ($P<0.01$), while the relative abundance of Bacteroidetes decreased significantly ($P<0.01$) in Galla Chinensis group. In Baiyaojian group, the relative abundance of Proteobacteria and Actinobacteria increased significantly ($P<0.01$), while the relative abundance of Firmicutes increased and the relative abundance of Bacteroidetes decreased, but there was no significant difference. At the genus level, the relative abundance of *Bacteroides*, *Allobaculum* and *Ruminococcus* decreased significantly ($P<0.01$), the relative abundance of *Roseburia*, *Prevotella*, *Oscillospira* and *Paraprevotella* increased significantly ($P<0.05$, $P<0.01$) in Galla Chinensis group. In Baiyaojian group, the relative abundance of *Bacteroides* and *Allobaculum* decreased significantly ($P<0.05$, $P<0.01$), and the relative abundance of *Prevotella*, *Oscillospira*, *Roseburia* and *Ruminococcus* increased significantly ($P<0.01$). Compared with model group, colon tissue of Galla Chinensis group and Baiyaojian group was recovered obviously, congestion was alleviated, only scattered ulcers were seen. The expression of Occludin and ZO-1 increased, and the expression level of Baiyaojian group was higher than that of Galla Chinensis group. **Conclusion:** The effect of Baiyaojian is better than Galla Chinensis in the treatment of UC. The mechanism may be through regulating the abundance and diversity of intestinal flora, improving the disorder of intestinal flora and increasing the expression of ZO-1 and Occludin and protecting the intestinal mucosal barrier function for alleviating intestinal inflammation.

[Keywords] Galla Chinensis; Baiyaojian; ulcerative colitis; intestinal flora; 16S rRNA high-throughput sequencing; intestinal mucosal barrier; tight junction

溃疡性结肠炎(UC)是一种常见的慢性非特异性炎症性肠道疾病,临床主要表现为腹痛、腹泻、脓血便等,具有病程长、反复发作、难以治愈等特点,其发病机制尚不十分明确^[1]。近年来UC在我国的发病率逐年上升,研究表明肠道菌群失调和肠黏膜屏障破坏在UC发病机制中发挥重要作用^[2],肠道菌群的紊乱会损伤肠黏膜细胞,影响肠黏膜的菌群屏障功能,破坏肠黏膜的机械屏障和免疫屏障。紧密连接(TJ)是肠黏膜屏障的重要组成部分,包括密封蛋白-1(Claudin-1),闭合蛋白(Occludin)等膜蛋白和闭锁小带蛋白-1(ZO-1)等外周胞质蛋白;Occludin蛋白负责调控TJ的通透性、维持细胞极性,ZO-1能够将胞质蛋白与细胞骨架系统稳定的连接在一起,维持TJ完整性^[3]。提示针对肠道菌群和肠黏膜屏

障进行干预是治疗UC的有效靶点^[4-5]。

百药煎是由五倍子同酒糟或酒曲及茶叶经发酵制成的块状物,始见于《太平惠民和剂局方》,具有清热化痰、生津止渴的功效^[6],用于治疗久咳痰多、咽痛、便血、久痢脱肛、口疮、牙疳、痈肿疮疡^[7]。五倍子为漆树科植物盐肤木、青麸杨或红麸杨叶上的虫瘿,主要由五倍子蚜寄生而形成,具有敛肺降火、涩肠止泻、敛汗、止血、收湿敛疮的功效^[8]。五倍子归经涉及大肠经,百药煎归经涉及胃经,均可能对肠道疾病有治疗作用,临床以五倍子复方治疗UC和内痔等肛肠疾病有较好疗效^[9-12],但其作用机制及发酵前后作用差异目前尚无文献报道。

本课题组前期对五倍子及其发酵品百药煎的药理作用进行了初步研究,发现百药煎抗炎镇痛、

止咳化痰作用较五倍子增强,其抗炎机制与抑制肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素(IL)-6和IL-1 β 等炎症因子的释放有关^[13]。基于此,本实验拟建立右旋葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的UC小鼠模型,运用16S rRNA高通量测序分析方法研究五倍子和百药煎对UC小鼠模型肠道菌群组成和多样性的影响,采用苏木素-伊红(HE)染色观察结肠组织病理学变化,并结合免疫组化(IHC)比较五倍子和百药煎对小鼠结肠组织Occludin和ZO-1表达的影响,以期阐释五倍子和百药煎治疗UC的作用机制及其差异,为二者的临床应用提供实验依据。

1 材料

N13462C型移液器和5424R型高速台式冷冻离心机(德国Eppendorf公司),MiFly-6型离心机(合肥艾本森科学仪器有限公司),Nano Drop200型微量分光光度计(美国Thermo公司),DYY-6C型电泳仪(北京市六一仪器厂),GeneAmp[®] 9700型聚合酶链式反应(PCR)仪(美国Applied Biosystems公司),ELx800型酶标仪(美国伯腾公司),Quantus™ Fluorometer型荧光计(美国Promega公司),Illumina Miseq型测序仪(美国Illumina公司),QL-901型旋涡混合器(海门其林贝尔仪器制造有限公司),TL-48R型粉碎研磨仪(上海万柏生物科技有限公司),RM2016型病理切片仪(上海徠卡仪器有限公司),KD-P型组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司),DHG-9140A型烤箱(上海慧泰仪器制造有限公司),P70D20TL-P4型微波炉(格兰仕微波炉电器有限公司),D1008E型掌上离心机和TSY-B型脱色摇床(武汉赛维尔生物科技有限公司),XSP-C20型显微镜(上海康耐视公司);JJ-12J型脱水机,JB-L5型冻台和JB-P5型包埋机(武汉俊杰电子有限公司)。

DSS(上海凇恩科技发展有限公司,批号R005985),美沙拉嗪肠溶片(黑龙江天宏药业股份有限公司,批号20180303,规格0.25 g/片),DNA抽提试剂盒(美国伯腾公司,批号201806008),琼脂糖凝胶(西班牙Biowest公司,批号20180705),DNA聚合酶(北京全式金生物技术有限公司,批号AP221-01);柠檬酸抗原修复液(pH 6.0),磷酸盐缓冲液(PBS),双氧水,牛血清白蛋白(BSA),苏木素染液,苏木素分化液,苏木素返蓝液,中性树胶,Occludin抗体,ZO-1抗体,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗,二氨基联苯胺(DAB)显色剂(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为G1202,

G0002, G0115, G5001, G1004, G1039, G1040, G1403, GB11032, GB11195, GB23303, G1211)。

五倍子购自安徽石田中药饮片有限公司(批号160429),经河南中医药大学张振凌教授鉴定为漆树科植物盐肤木 *Rhus chinensis* 叶上的虫瘿,符合2020年版《中华人民共和国药典》(一部)的相关规定。百药煎为实验室自制(批号20180307),其制备方法为取茶叶适量,加15倍量水煎煮3次,每次煎煮20 min,纱布滤过,合并滤液,加热浓缩至适量,放凉,与酒糟混合;另取五倍子细粉适量,与上述混合物加水适量搅匀,制成软块,发酵,待药块表面遍布白色“霉衣”时,取出,切成小方块,低温干燥。每100 g五倍子,加茶叶6.2 g和酒糟25 g。其质量符合2015年版《浙江省中药炮制规范》“百药煎”项下各项规定,没食子酸质量分数41.94%。

清洁级C57BL/6小鼠,雄性50只,体质量(20±2) g,由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供,许可证号SCXK(鲁)2014-0007。本文涉及的动物实验经河南中医药大学实验动物伦理委员会批准后进行,批准编号DWLL201803239。

2 方法

2.1 药物配制 精密称定DSS 30 g溶于1 L水中,配制3% DSS溶液;取美沙拉嗪肠溶片12片,研钵研碎后溶于40 mL蒸馏水中,配成0.075 g·mL⁻¹美沙拉嗪水溶液;分别取五倍子45 g和百药煎67.5 g,加入10倍量水煎煮3次,每次30 min,纱布滤过,合并滤液,加热浓缩至250 mL,得生药质量浓度分别为0.18, 0.27 g·mL⁻¹的五倍子水煎液和百药煎水煎液。

2.2 模型制备、分组及给药 小鼠适应性饲养3 d后,随机分为5组,每组10只。随机取其中1组为空白组,给予纯净水。其余4组自由饮用3% DSS溶液7 d造模,造模结束后各组随机抽取1只小鼠,剖腹摘取结肠,观察结肠组织,取8 cm同水平肠段做病理组织切片,以确定造模是否成功^[14];造模成功后,随机取1组为模型组,另外3组为给药组,分别为美沙拉嗪组(0.8 g·kg⁻¹),五倍子组和百药煎组。空白组和模型组灌胃给予生理盐水,给药组分别给予美沙拉嗪溶液、五倍子水煎液和百药煎水煎液,连续给药7 d。五倍子、百药煎成人每日最大剂量分别为6, 9 g,根据公式小鼠灌胃量(g·kg⁻¹)=成人每日临床常用量/成人质量(60 kg)×9,计算得小鼠日给生药量为五倍子0.9 g·kg⁻¹,百药煎1.35 g·kg⁻¹。预实验设置五倍子和百药煎低剂量组的剂量分别为0.45, 0.675 g·kg⁻¹,中剂量组给药剂量分别为0.9,

1.35 g·kg⁻¹,高剂量组剂量分别为1.8, 2.7 g·kg⁻¹, 结果发现以高剂量组药效最好,故二者给药剂量分别选择1.8, 2.7 g·kg⁻¹,配制药物时均使用无菌水。

2.3 样本收集及指标检测

2.3.1 一般状态和疾病活动指数(DAI)评分 每天观察并记录小鼠状态,包括饮食饮水情况、大便及体质量变化情况。按照DAI评分标准进行评分。评分标准包括动物体质量下降率(体质量下降率0为0分,1%~5%为1分,6%~10%为2分,11%~15%为3分,>15%为4分),粪便性状(正常为0分,介于正常与松散状之间为1分,松散状为2分,介于松散状与稀便之间为3分,稀便为4分),便血情况(无便血为0分,介于无便血与隐血之间为1分,隐血阳性为2分,介于隐血与肉眼血便之间3分,肉眼血便为4分)^[15],计算方法为DAI=(体质量下降率分值+粪便性状分值+便血情况分值)/3。

2.3.2 结肠组织及粪便样本获取 小鼠末次给药1 h后颈椎脱臼法处死,立即解剖,取结肠段内粪便,置离心管中,-80℃保存。用剪刀将结肠组织周围脂肪组织去除,生理盐水洗净,测定结肠质量和长度^[16]。

2.3.3 结肠组织病理学检测 将结肠组织固定于4%多聚甲醛24 h以上。梯度乙醇脱水,二甲苯透明,将组织浸蜡、包埋,切片(厚度4 μm),脱蜡,苏木素染色3~5 min,洗涤,分化,伊红溶液染色30 s,梯度乙醇脱水,二甲苯透明处理,中性胶密封,显微镜下观察其病理变化^[17]。

2.3.4 结肠中Occludin和ZO-1蛋白表达 将石蜡切片脱蜡,置于盛满柠檬酸抗原修复液的修复盒中,于微波炉内进行抗原修复,阻断内源性过氧化物酶,BSA封闭,加双抗(1:3 000),DAB显色,显微镜下控制显色时间,阳性为棕黄色,自来水冲洗切片终止显色。苏木素复染3 min左右,自来水洗,苏木素分化液分化数秒,自来水冲洗,苏木素返蓝液返蓝,流水冲洗;脱水封片,显微镜镜检^[18]。应用Image-Pro Plus 6.0软件测量切片单位像素吸光度^[19]。

2.4 肠道菌群分析

2.4.1 小鼠粪便基因组提取及PCR扩增 小鼠粪便样品送至深圳微生太科技有限公司进行16S rRNA测序,全程按照试剂盒说明书进行操作。采用DNA提取试剂盒进行粪便总基因组DNA提取,利用分光光度计检测DNA的纯度和浓度;1%琼脂糖凝胶电泳,检测DNA完整性^[20]。提取的DNA进行PCR扩增,引物对应区域为16S V3-V4区,上游

引物338F序列5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3',下游引物806R序列5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3',引物长度468 bp。反应总体积20 μL,5×FastPfu Buffer 4 μL,2.5 mmol·L⁻¹ dNTPs 2 μL, Forward Primer(浓度5 μmol·L⁻¹)0.8 μL, Reverse Primer(浓度5 μmol·L⁻¹)0.8 μL, FastPfu DNA聚合酶0.4 μL, BSA 0.2 μL,模板DNA 10 ng,补充双蒸水至20 μL。PCR反应参数为95℃预变性3 min;95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸45 s,27个循环;72℃延伸10 min,10℃停火^[21]。使用2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。使用AxyPrep DNA凝胶提取试剂盒对PCR产物进行纯化,采用Quantus™ Fluorometer型荧光计进行定量检测^[22]。

2.4.2 构建PE文库及Illumina测序 使用NEXTflex Rapid DNA-Seq Kit进行建库,接头链接,使用磁珠筛选去除接头自连片段,利用PCR扩增进行文库模板的富集,磁珠回收PCR产物得到最终的文库^[23-24]。利用Illumina Miseq PE300平台对样本进行双端测序。使用Qiime 2软件,分别通过操作分类单元(OTUs)的韦恩(Venn)图分析,偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA),物种及其丰度分析及主坐标分析进行处理,对每个样品在7个分类水平上的序列数目占总序列数的比例进行统计,计算observed OTUs, Shannon指数及系统发育多样性(PD)指数等度量指数,评估样品中菌群的丰富度和均匀度^[25-26]。

2.5 统计学方法 数据分析采用SPSS 22.0统计学软件,正态分布连续性资料以 $\bar{x}\pm s$ 形式表示,各组间比较采用单因素方差分析,两两比较时采用最小显著性差异法(LSD)-*t*检验及Dunnett-*t*检验。 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般状态及DAI评分

3.1.1 一般状态观察 造模后,空白组小鼠状态良好,饮食饮水量和排便情况正常,体质量呈上升趋势;其余各组小鼠精神呆滞,活动能力下降,饮食饮水量减少,出现不同程度大便稀溏、便血的情况。与空白组比较,自造模第3天起,模型组小鼠体质量开始下降,造模第7天体质量显著下降($P<0.01$)。经治疗后,美沙拉嗪组、五倍子组和百药煎组小鼠精神状态有所改善,饮食饮水量增加;第12天时,与模型组比较,美沙拉嗪组、百药煎组及五倍子组小鼠体质量明显回升($P<0.05$, $P<0.01$)。见图1。

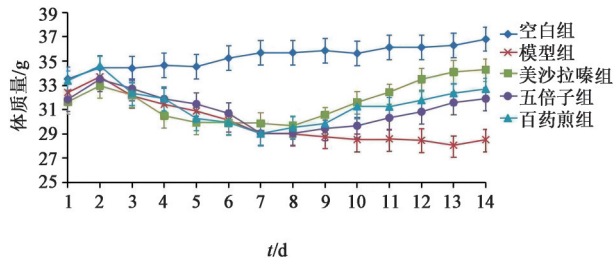


图1 各组小鼠造模前后体质量变化情况($\bar{x}\pm s, n=10$)

Fig. 1 Changes of body weight of mice in each group before and after modeling ($\bar{x}\pm s, n=10$)

3.1.2 DAI比较 从造模开始每天评估各组小鼠DAI评分,除空白组外,其余各组小鼠造模后第2天出现排便次数增加,粪便出现松散样、水样便等;在第4天出现大便隐血情况,第5天出现肉眼血便。第6天时,与空白组比较,其余各组小鼠DAI评分显著升高($P<0.01$),表明UC模型造模成功。经药物治疗后,第14天时,与模型组比较,美沙拉嗪组和百药煎组DAI评分明显降低($P<0.05$),五倍子组DAI评分降低,但差异无统计学意义。表明五倍子和百药煎均对UC小鼠有一定的治疗作用,且百药煎组优于五倍子组。见图2。

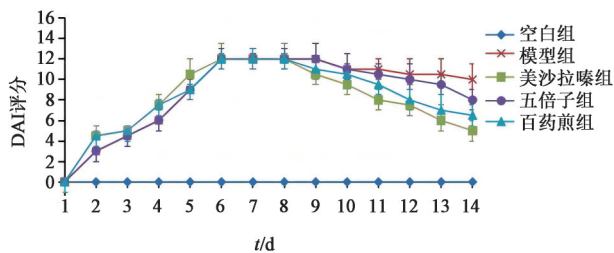
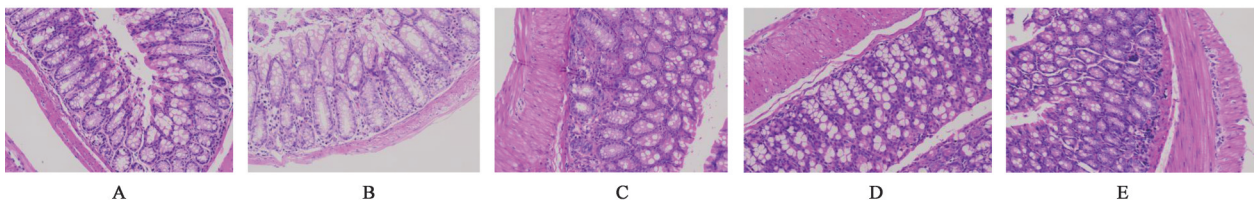


图2 各组小鼠造模前后DAI评分比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

Fig. 2 DAI scores of mice in each group before and after modeling ($\bar{x}\pm s, n=10$)



A. 空白组;B. 模型组;C. 美沙拉嗪组;D. 五倍子组;E. 百药煎组(图4~8同)

图3 百药煎对UC小鼠结肠组织的影响(HE, $\times 200$)

Fig. 3 Effect of Baiyaojian on colon tissue of UC mice (HE, $\times 200$)

3.3 各组小鼠肠道菌群对比分析

3.3.1 菌群丰度变化 采用Venn图分析各组间菌群OTU数量及其种类交叉情况,采用PLS-DA检测样本间菌群丰度整体差异^[27]。结果显示,空白组、模型组、美沙拉嗪组、五倍子组、百药煎组的总OTUs分别为531, 550, 529, 537, 528个,特异性

3.2 结肠组织病理学观察

3.2.1 结肠长度与质量 造模完成后,与空白组比较,模型组结肠的长度显著缩短($P<0.01$),质量显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,美沙拉嗪组、百药煎组和五倍子组结肠长度显著增加($P<0.05, P<0.01$),结肠质量则显著降低($P<0.05, P<0.01$)。百药煎组结肠长度长于五倍子组、质量低于五倍子组,但差异均无统计学意义。说明五倍子收敛作用较百药煎强,五倍子发酵为百药煎后涩肠作用减弱。见表1。

表1 各组小鼠结肠长度与质量测量($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Colon length and weight of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	长度/cm	质量/mg
空白		48.90 \pm 1.24	240.90 \pm 24.20
模型		40.83 \pm 2.54 ²⁾	299.27 \pm 21.40 ²⁾
美沙拉嗪	0.8	46.90 \pm 1.35 ⁴⁾	274.76 \pm 24.01 ³⁾
五倍子	1.8	45.87 \pm 3.21 ³⁾	224.76 \pm 23.64 ⁴⁾
百药煎	2.7	47.83 \pm 1.12 ⁴⁾	200.87 \pm 23.31 ⁴⁾

注:与空白组比较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)。

3.2.2 小鼠结肠组织病理改变 HE染色结果显示,空白组小鼠结肠组织未见溃疡及坏死,黏膜上皮完整;模型组结肠组织充血增厚,出现明显溃疡,黏膜及黏膜下层有炎性细胞浸润;美沙拉嗪组和百药煎组结肠组织明显恢复,充血情况改善,仅见散在小溃疡,结肠黏膜及黏膜下层少见炎性细胞浸润;五倍子组结肠组织和充血情况有所改善,仍可见明显溃疡,结肠黏膜及黏膜有少量炎性细胞浸润。见图3。

OTUs分别为130, 74, 71, 114, 101个,5组共有OTUs为133个。PLS-DA结果显示,各组间区分明显。UC小鼠肠道菌群丰度及结构发生明显改变,经五倍子和百药煎干预后可以改善这种变化。见增强出版附件材料。

3.3.2 菌群多样性分析 Alpha多样性指数是对某

个样品中物种多样性的分析,包含样品中物种组成的丰富度和均匀度2个因素,通常用 observed OTUs, Shannon 指数及 PD 指数等评估^[28-30]。数值越高,表明菌群多样性越复杂。由表2可知,与空白组比较,模型组 observed OTUs 显著降低($P<0.01$), Shannon 指数和 PD 指数明显降低($P<0.05$);与模型

组比较,美沙拉嗪组、五倍子组和百药煎组 observed OTUs 显著升高($P<0.01$), Shannon 指数和 PD 指数明显升高($P<0.05$)。计算各组样品的 Alpha 多样性指数,制作稀释曲线(增强出版材料)。表明 DSS 诱导的 UC 模型小鼠肠道菌群物种丰度和多样性降低,经五倍子和百药煎治疗,有助于肠道菌群恢复。

表2 百药煎对 UC 小鼠肠道菌群 Alpha 多样性的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 2 Effect of Baiyaojian on Alpha diversity of intestinal flora in UC mice ($\bar{x}\pm s, n=5$)

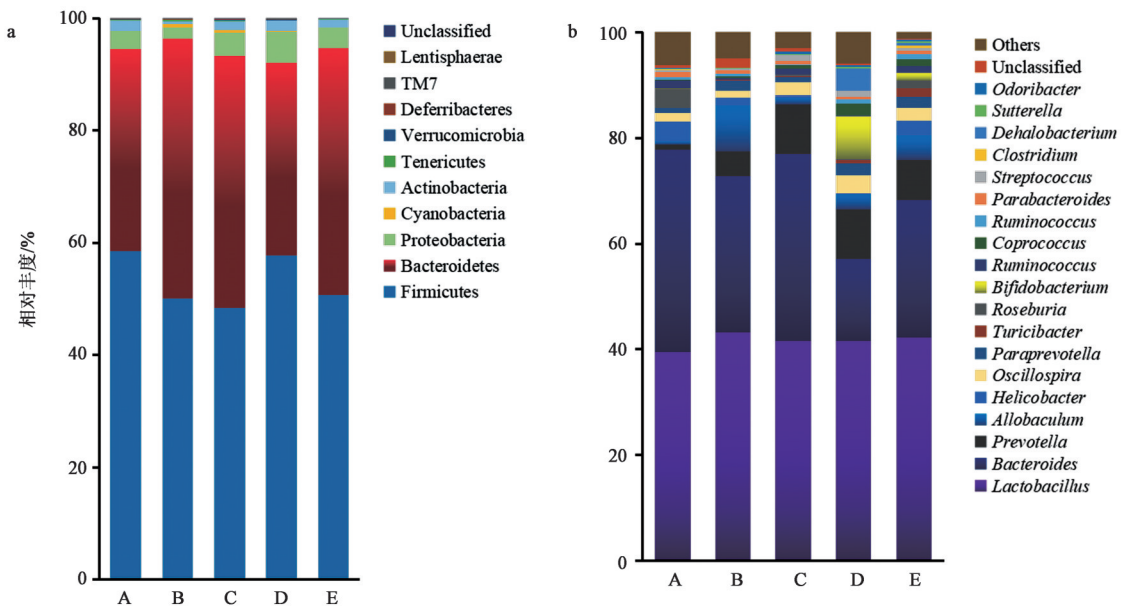
组别	剂量/g·kg ⁻¹	observed OTUs/个	Shannon 指数	PD 指数
空白		240.60±7.83	5.67±0.40	15.34±0.58
模型		170.00±6.60 ²⁾	4.97±0.66 ¹⁾	13.59±0.37 ¹⁾
美沙拉嗪	0.8	236.75±4.92 ⁴⁾	5.64±0.40 ³⁾	15.62±0.47 ³⁾
五倍子	1.8	206.00±5.79 ⁴⁾	5.53±0.60 ³⁾	14.65±0.39 ³⁾
百药煎	2.7	218.00±4.98 ⁴⁾	5.94±0.33 ³⁾	15.46±0.28 ³⁾

3.3.3 菌群物种注释和差异分析 根据 OTU 的绝对丰度和注释信息,对每个样品在门水平和属水平上的序列数目占总序列数的比例进行统计分析,评估每个组在门水平和属水平的物种组成差异^[31-35],见图4。结果显示,检测出了10个菌门,其中以拟杆菌门(Bacteroidetes),厚壁菌门(Firmicutes),变形菌门(Proteobacteria)和放线菌门(Actinobacteria)4个菌门为主。与空白组比较,模型组厚壁菌门、变形菌门和放线菌门相对丰度显著减少($P<0.01$),拟杆菌门相对丰度显著增加($P<0.01$)。与模型组比较,美沙拉嗪组拟杆菌门和厚壁菌门相对丰度减少,但差异无统计学意义,变形菌门和放线菌门相对丰度则显著增加($P<0.01$);五倍子组厚壁菌门、变形菌门和放线菌门相对丰度显著增加($P<0.01$),拟杆菌门相对丰度显著减少($P<0.01$);百药煎组变形菌门和放线菌门相对丰度显著增加($P<0.01$),厚壁菌门相对丰度增加和拟杆菌门相对丰度减少,但差异均无统计学意义。在属水平上,与空白组比较,模型组乳酸菌属(*Lactobacillus*),普雷沃菌属(*Prevotella*),厚壁菌门的 *Allobaculum* 和帕拉普氏菌属(*Paraprevotella*)相对丰度显著升高($P<0.05, P<0.01$);颤螺旋菌属(*Oscillospira*),拟杆菌属(*Bacteroides*),罗斯氏菌属(*Roseburia*)和瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)相对丰度显著降低($P<0.05, P<0.01$)。与模型组比较,美沙拉嗪组乳酸菌属相对丰度降低,但差异无统计学意义, *Allobaculum* 和帕拉普氏菌属相对丰度显著降低($P<0.01$),拟杆菌属、罗斯氏菌属、普雷沃菌属、瘤胃球菌属和颤螺旋菌属相对丰度显著升高($P<0.05, P<0.01$);五倍子组

乳酸菌属相对丰度降低,但差异无统计学意义,拟杆菌属、瘤胃球菌属和 *Allobaculum* 相对丰度显著降低($P<0.01$),罗斯氏菌属、普雷沃菌属、颤螺旋菌属和帕拉普氏菌属丰度显著升高($P<0.05, P<0.01$);百药煎组乳酸菌属相对丰度降低,但差异无统计学意义,拟杆菌属和 *Allobaculum* 相对丰度显著降低($P<0.05, P<0.01$),帕拉普氏菌属相对丰度升高,但差异无统计学意义,普雷沃菌属、颤螺旋菌属、罗斯氏菌属和瘤胃球菌属丰度显著升高($P<0.01$)。

进一步采用 LEfSe 比较各组间显著性差异物种,以线性判别分析(LDA)分值>3.5为筛选标准,确定组中相对丰度较高的微生物^[36-37]。结果显示,5组共得到25个丰度靠前的显著差异物种。空白组的差异类群在芽孢杆菌纲(Bacilli)相对丰度较高,差异物种为 *B. animalis*;模型组的差异类群在 *Lactobacillus* 相对丰度较高,差异物种为 *L. reuteri*;美沙拉嗪组的差异类群在 Erysipelotrichi 和梭菌属(*Clostridium*)相对丰度较高,差异物种为 *C. cocleatum*;五倍子组的差异类群在 *Clostridium*,布劳特氏菌属(*Blautia*)和毛螺菌科(Lachnospiraceae)相对丰度较高,差异物种为 *C. aldenense, C. ramosum, B. eggerthii* 和 *B. producta*;百药煎组的差异类群在放线菌纲(Actinobacteria)和双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)相对丰度较高。见图5。

3.4 结肠中 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达水平 与空白组比较,模型组 Occludin 和 ZO-1 的表达量显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,美沙拉嗪组 ZO-1 和 Occludin 表达量明显升高($P<0.05, P<0.01$);五倍子组 Occludin 和 ZO-1 的表达量升高,但差异无统计学



a. 门水平; b. 属水平

图4 各组小鼠肠道菌群在不同分类水平的相对丰度

Fig. 4 Relative abundance of intestinal flora of mice in each group at different taxonomic levels

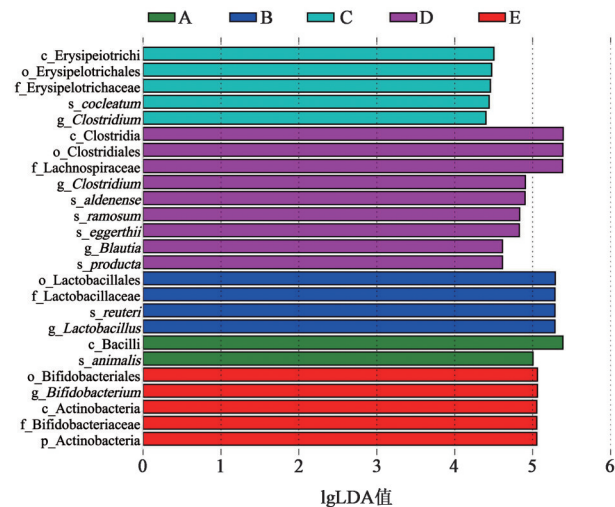


图5 各组小鼠肠道菌群组间差异显著物种筛选

Fig. 5 Species with significant difference in intestinal flora of mice from each group

意义;百药煎组 ZO-1 表达量升高,但差异无统计学意义, Occludin 表达量则明显升高 ($P < 0.05$)。表明五倍子和百药煎均可以通过升高 ZO-1 和 Occludin 表达保护 UC 小鼠肠道黏膜屏障功能,且百药煎作用强于五倍子。见表 3 和图 6, 7。

表3 百药煎对小鼠肠道 Occludin 和 ZO-1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Baiyaojian on expression of Occludin and ZO-1 in intestinal tract of mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	Occludin	ZO-1
空白	0.015 17±0.000 1	0.005 58±0.000 0
模型	0.001 53±0.000 0 ¹⁾	0.000 29±0.000 0 ¹⁾
美沙拉嗪	0.012 53±0.000 1 ³⁾	0.004 59±0.000 0 ²⁾
五倍子	0.004 97±0.000 1	0.003 09±0.000 0
百药煎	0.008 35±0.000 0 ²⁾	0.004 20±0.000 0

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。

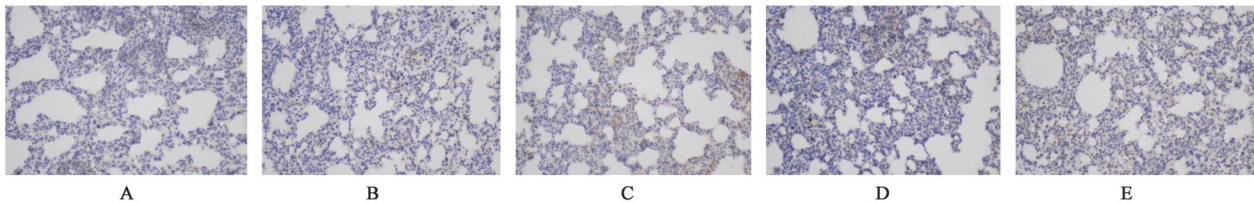


图6 百药煎对小鼠结肠组织 Occludin 蛋白表达的影响 (IHC, ×200)

Fig. 6 Effect of Baiyaojian on expression of Occludin protein in colon tissue of mice (IHC, ×200)

4 讨论

UC是由多种原因引起的具有慢性和复发性特征的炎症性肠病。UC的病因病机,中医认为是由于湿热、饮食所伤、情志不畅或劳倦过度等,导致脾

气受损、脾失健运,湿从内生,多从热化,湿热熏蒸,壅滞肠间,传导失司,与气血相搏,损伤气络,气凝血滞,血败肉腐,内成溃疡。日久波及肾脏,脾肾两虚,正虚邪恋,缠绵难愈。因此,湿邪内蕴、气血壅

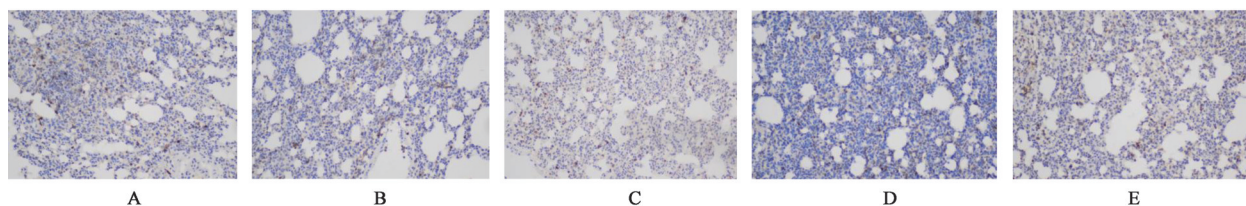


图7 百药煎对小鼠结肠组织ZO-1蛋白表达的影响(IHC,×200)

Fig. 7 Effect of Baiyaojian on expression of ZO-1 protein in colon tissue of mice (IHC,×200)

滞、脾肾亏虚是该病发作的关键;湿邪内蕴为标实,脾肾亏虚为本虚^[38]。在活动期治疗以清热祛湿、凉血止血为主,辅以益气健脾,标本兼顾。中医药在整体观念和辨证论治理论指导下,治疗UC具有明显特色与优势,可以通过修复肠道黏膜屏障,促进溃疡愈合,进而减轻免疫反应及炎症反应,达到对UC的治疗作用。临床常用中药复方有芍药汤、白头翁汤、葛根芩连汤、参苓白术散等加减,乌梅败酱方,五倍子液灌肠加真人养脏汤,复方五倍子栓,五倍子合剂等^[39]。

本实验采用DSS诱导的UC小鼠模型进行研究,结果发现UC小鼠肠道菌群发生紊乱,菌群多样性和丰度显著降低,肠道黏膜出现炎症。给予五倍子和百药煎治疗后,肠道菌群结构逐渐恢复,且百药煎组恢复效果优于五倍子组,表明五倍子和百药煎均可通过恢复肠道菌群来减轻肠道炎症。IHC结果表明UC模型小鼠的肠黏膜中Occludin和ZO-1蛋白表达较空白组显著降低,与文献报道一致;给予五倍子、百药煎后,模型小鼠的ZO-1和Occludin表达量升高,表明五倍子和百药煎可通过修复肠黏膜屏障功能治疗UC。结合本课题组前期研究认为,五倍子中鞣质质量分数达70%以上,在正常小鼠肠道菌群作用下鞣质可分解为小分子活性物质,但由于UC小鼠肠道菌群紊乱,分解鞣质能力下降,鞣质与肠道中蛋白结合,对肠黏膜具有一定刺激性,不利于UC肠黏膜屏障功能的恢复。在百药煎发酵过程中,微生物将鞣质水解为没食子酸、没食子酸甲酯、没食子酸乙酯、表没食子儿茶素等小分子活性物质^[40],进入肠黏膜细胞中,发挥治疗UC的作用,因此发酵后的百药煎治疗效果优于五倍子。

本研究探讨了五倍子和百药煎对UC小鼠肠道菌群及肠黏膜屏障功能的影响,结果表明五倍子和百药煎可以通过恢复肠道菌群,增加紧密连接蛋白的表达对UC发挥治疗作用;阐释了五倍子和百药煎在临床上治疗UC的科学内涵,同时,提示在临床上治疗UC和内痔等肛肠疾病宜选用发酵后百药煎。然而,本研究亦发现与空白组比较,UC小鼠肠

道中厚壁菌门、变形菌门和放线菌门相对丰度减少,拟杆菌门相对丰度增加,这与以往文献报到的UC患者肠道中厚壁菌门、拟杆菌门等益生菌的数目减少,变形菌、梭状芽胞杆菌等致病菌的数目增多的结果不太一致^[41];另外,百药煎中没食子酸等小分子活性物质进入肠黏膜细胞后是如何发挥治疗UC的作用,其分子作用机制尚不清楚,有待于进一步实验研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 刘姝,王飞. 溃疡性结肠炎患者肠道菌群紊乱与Th17/Treg及其分泌炎性细胞因子免疫平衡的关系[J]. 现代医学,2020,48(7):862-867.
- [2] 张小强,刘竺华. 溃疡性结肠炎发病机制与肠黏膜屏障的关系[J]. 中国民间疗法,2019,27(10):106-107.
- [3] 谭悦,郑长清. 紧密连接蛋白Occludin、ZO-1在溃疡性结肠炎中的表达及其临床意义[J]. 现代药物与临床,2018,33(7):1803-1808.
- [4] TATIYA-APHIRADEE N, CHATUPHONPRASERT W, JARUKAMJORN K. Immune response and inflammatory pathway of ulcerative colitis[J]. J Basic Clin Physiol Pharmacol,2018,30(1):1-10.
- [5] SCHIRMER M, DENSON L, VLAMAKIS H, et al. Compositional and temporal changes in the gut microbiome of pediatric ulcerative colitis patients are linked to disease course[J]. Cell Host Microbe,2018,24(4):600-610.
- [6] 陈晶晶,张振凌,曹森森,等. 百药煎HPLC指纹图谱的建立及其中5种成分的含量测定[J]. 中国药房,2020,31(2):173-178.
- [7] 王瑞生,张振凌,陈祎甜,等. 基于寒热证模型大鼠研究五倍子发酵百药煎的药性变化和归属[J]. 中国中药杂志,2019,44(10):2084-2089.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:68.
- [9] 施中华,余建法. 复方五倍子栓治疗溃疡性结肠炎32例临床观察[J]. 中国中医药科技,2010,17(1):79.
- [10] 施中华. 五倍子合剂治疗溃疡性结肠炎32例[J]. 中国中医药科技,1999,6(4):269.

- [11] 吴连恩,杨建平. 五倍子灌肠液治疗慢性溃疡性结肠炎60例[J]. 江苏中医,1999,20(6):3-5.
- [12] 叶利群,鲜红. 五倍子的药理研究及在治疗肛肠疾病中的应用[J]. 中国民族民间医药,2010,19(14):49,53.
- [13] 陈祎甜,张振凌,王瑞生,等. 五倍子发酵炮制百药煎主要药理作用比较研究[J]. 中华中医药学刊,2021,39(1):187-192.
- [14] 李自辉,庞牧,林佩琦,等. 基于16S rRNA技术分析柴胡龙骨牡蛎汤对精神分裂症大鼠肠道菌群多样性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(13):1-8.
- [15] BOKULICH N A, KAEHLER B D, RIDEOUT J R, et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin[J]. Microbiome,2018,6(1):90.
- [16] CALLAHAN B J, MCMURDIE P J, ROSEN M J, et al. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data[J]. Nat Methods,2016,13(7):581-583.
- [17] 何涛宏,陈敏,郝亮亮,等. 盐酸小檗碱对溃疡性结肠炎大鼠炎症的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2020,36(21):3461-3464.
- [18] LIU J L, GAO Y Y, ZHOU J, et al. Changes in serum inflammatory cytokine levels and intestinal flora in a self-healing dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis murine model[J]. Life Sci,2020,263:118587.
- [19] 孙中美,李军祥,路琼琼,等. 青黛通过影响GPR41/43信号通路调控溃疡性结肠炎大鼠Treg/Th17免疫平衡的机制研究[J]. 中国中医急症,2021,30(4):604-607.
- [20] 施丽婕,刘苏仪,于潇,等. 化癥通阳方对溃疡性结肠炎模型大鼠肠道菌群和氨基酸代谢的影响[J]. 中医杂志,2020,61(19):1731-1737.
- [21] 王瑾,冉倩,王琳,等. 基于16S rRNA技术分析黄连酒蒸前后对正常及2型糖尿病大鼠肠道微生物的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(22):92-102.
- [22] 曹晖,吴东升,张彧,等. 基于高通量测序技术研究芍药汤对溃疡性结肠炎大鼠肠道菌群的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2021,28(1):61-66.
- [23] 吴梦竹,张梨,李廷林,等. 基于心与小肠相表里探析肠道菌群与糖尿病认知障碍的关联[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(3):231-237.
- [24] GHYSELINCK J, VERSTREPEN L, MOENS F, et al. A 4-strain probiotic supplement influences gut microbiota composition and gut wall function in patients with ulcerative colitis[J]. Int J Pharm,2020,587:119648.
- [25] 陈杨,施丽婕,刘雷蕾,等. 基于16S rDNA测序研究化癥通阳方对溃疡性结肠炎大鼠肠道菌群的影响[J]. 中华中医药杂志,2020,35(2):941-946.
- [26] 吴昊,于小红,王焕君,等. 雷公藤对右旋葡聚糖硫酸钠诱导的溃疡性结肠炎小鼠肠道菌群的影响[J]. 中草药,2020,51(2):387-396.
- [27] WU Y R, KUANG G Y, LU F G, et al. Pathological relationship between intestinal flora and osteoarthritis and intervention mechanism of Chinese medicine[J]. Chin J Integr Med,2019,25(9):716-720.
- [28] 周国佩,吴帆,朱金华,等. 乌梅丸对2型糖尿病模型大鼠肠道菌群、炎症因子及短链脂肪酸的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(10):8-15.
- [29] 刘立萍,李然,姜楠,等. 基于肠道菌群探讨苓桂术甘汤对瘦素缺陷代谢紊乱模型小鼠的骨保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(20):19-24.
- [30] MISHIMA Y, SATRTOR R B. Manipulating resident microbiota to enhance regulatory immune function to treat inflammatory bowel diseases[J]. J Gastroenterol,2020,55(1):4-14.
- [31] 惠毅,闫曙光,李京涛,等. 小檗碱与6-姜烯酚配伍对溃疡性结肠炎小鼠结肠上皮细胞Notch信号通路的影响[J]. 中草药,2019,50(13):3147-3154.
- [32] 贺庆芝,罗晓清,马芙蓉,等. 鼠原体改善DSS诱导的小鼠溃疡性结肠炎的作用研究[J]. 微生物学报,2020,60(4):695-702.
- [33] 李裕思,许华冲,王俊月,等. 16S rRNA基因测序技术分析肝阳上亢型脑出血患者的肠道菌群结构[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(8):83-88.
- [34] 何启卓,郭彩霞. 溃疡性结肠炎与克罗恩病患者肠道优势菌群的特征及与发病关系的研究[J]. 中国中西医结合消化杂志,2019,27(11):844-849.
- [35] 单琳琳,陆为民,张卿. 清溃愈疡汤对溃疡性结肠炎肠道菌群、炎症应激及相关因子水平的影响[J]. 中国病原生物学杂志,2019,14(10):1211-1214.
- [36] 马红梅. 溃疡性结肠炎肠道菌群失调与免疫球蛋白水平相关性分析[J]. 中国肛肠病杂志,2019,39(10):31-32.
- [37] 吴东升,曹晖,张彧,等. 芍药汤对溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜免疫屏障的干预作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(9):6-11.
- [38] 吴东升,曹晖,张彧,等. 中医药干预溃疡性结肠炎Th17/Treg平衡的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(16):213-219.
- [39] 苟兰兰,沈洪. 古方加减治疗溃疡性结肠炎研究概况[J]. 山东中医药大学学报,2012,36(2):77-79.
- [40] 王瑞生,史莲莲,张振凌,等. HPLC指纹图谱研究五倍子发酵百药煎化学成分变化[J]. 中草药,2017,48(18):3734-3740.
- [41] 赵亮. 分泌型GRP78缓解DSS诱导的小鼠溃疡性结肠炎作用及其机制研究[D]. 武汉:华中科技大学,2019.

[责任编辑 刘德文]