

车前子多糖对膜性肾病大鼠肾损伤和肠道菌群的影响

赵宏, 陈晨, 赵岩, 汤威威, 高琪, 孔令洲, 于登君, 张宇*
(佳木斯大学药学院, 黑龙江佳木斯 154007)

[摘要] 目的:研究车前子多糖(PSP)对膜性肾病(MN)大鼠肾损伤的保护作用及对肠道菌群的影响,为PSP治疗MN的深入研究提供理论基础。方法:采用尾静脉注射阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA, 3.5 g·L⁻¹)诱导MN大鼠模型,造模周期为7周。于造模第4周,将造模成功大鼠按照随机数字法分为模型组,阳性药物组(盐酸贝那普利, 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹),PSP高剂量组(PSP-H, 800 mg·kg⁻¹·d⁻¹),PSP中剂量组(PSP-M, 400 mg·kg⁻¹·d⁻¹),PSP低剂量组(PSP-L, 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹),每组10只;另取10只未造模的大鼠为正常组。正常组和模型组大鼠灌服等体积生理盐水,各给药组大鼠灌服相应药物,每日1次,连续4周。实验结束后,采用光镜法分别观察大鼠肾脏及结肠组织病理变化,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测大鼠血清及结肠组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-1 β (IL-1 β)含量,免疫组织化学法检测大鼠肾组织中TNF- α ,IL-1 β 蛋白表达情况,运用16S rRNA测序法研究PSP对MN大鼠肠道菌群调节作用。结果:与正常组比较,模型组大鼠肾小球增大、基底膜增厚,结肠组织腺体萎缩,血清及结肠组织中TNF- α ,IL-1 β 含量明显上升($P<0.05$),TNF- α ,IL-1 β 蛋白表达显著增加($P<0.01$);与模型组比较,盐酸贝那普利组和PSP-H组大鼠肾小球囊腔减小、基膜增厚程度减轻,结肠组织中黏膜排列较整齐,但PSP-M,PSP-L组对肾组织及结肠组织改善效果不佳;PSP-H,PSP-M组大鼠血清及结肠组织中TNF- α ,IL-1 β 含量明显下降($P<0.05$),肾组织中TNF- α ,IL-1 β 蛋白表达显著降低($P<0.01$),PSP-L组差异无统计学意义;模型组大鼠肠道菌群中有害菌厚壁菌门丰度升高、有益菌拟杆菌门丰度降低;给予PSP后有害菌厚壁菌门丰度降低、有益菌拟杆菌门丰度升高,以PSP-H变化最为显著。结论:PSP可有效缓解MN大鼠的肾损伤、降低炎症因子表达,并可调节MN大鼠肠道菌群结构、改善受损的肠道屏障。

[关键词] 车前子; 多糖; 膜性肾病; 肾损伤; 肠道菌群

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)22-0092-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212101

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210923.1520.003.html>

[网络出版日期] 2021-09-24 9:35

Effect of Polysaccharides from Plantaginis Semen on Renal Injury and Gut Microbiota in Rats with Membranous Nephropathy

ZHAO Hong, CHEN Chen, ZHAO Yan, TANG Wei-wei, GAO Qi, KONG Ling-zhou,
YU Deng-jun, ZHANG Yu*

(College of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of polysaccharides from Plantaginis Semen (PSP) against renal injury in rats with membranous nephropathy (MN) and its influence on the gut microbiota to provide a theoretical basis for the further investigation of PSP in the treatment of MN. **Method:** The MN model was induced by tail vein injection of cationic bovine serum albumin (C-BSA, 3.5 g·L⁻¹) in rats with a modeling period of seven weeks. At the 4th week of modeling, the model rats were divided into a model group, a positive drug group (benazepril hydrochloride, 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹), a PSP high-dose group (PSP-H, 800 mg·kg⁻¹·d⁻¹), a

[收稿日期] 20210615(012)

[基金项目] 中央支持地方高校改革发展资金人才培养支持计划项目(2019zyzcd01);黑龙江省博士后专项经费项目(LBH-Q20185);黑龙江省北药与功能食品特色学科建设项目(2018-TSXK-02);佳木斯大学优秀学科团队项目(JDXKTD-2019005)

[第一作者] 赵宏,博士,副教授,硕士生导师,从事中药活性成分的结构和活性研究,Tel:0454-8610838,E-mail:zhaohong1981@jmsu.edu.cn

[通信作者] *张宇,硕士,教授,从事天然药物活性成分筛选及新药开发研究,E-mail:zhangyuh2003@163.com

PSP medium-dose group (PSP-M, $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), and a PSP low-dose group (PSP-L, $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) according to the random number table, with 10 in each group. Ten healthy rats were assigned to the normal control group. The rats in the normal control group and the control group received an equal amount of physiological saline by gavage, and those in the groups with drug intervention were administered correspondingly, once a day, for consecutive four weeks. The pathological changes of rat kidney and colon tissues were observed by optical microscopy. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the content of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin- 1β (IL- 1β) in the serum and colon tissues. The immunohistochemistry (IHC) was used to detect the protein expression of TNF- α and IL- 1β in renal tissues. The 16S rRNA sequencing method was used to investigate the effect of PSP on the gut microbiota in MN rats. **Result:** Compared with the normal control group, the model group showed enlarged glomeruli, thickened basement membrane, atrophied colonic gland, increased TNF- α and IL- 1β in the serum and colon tissues ($P < 0.05$), and elevated protein expression of TNF- α and IL- 1β ($P < 0.01$). Compared with the model group, the positive drug group and the PSP-H group displayed shrunk glomerular capsules, relieved basement membrane thickening, and neatly arranged colonic mucosa in colon tissues, while the PSP-M and PSP-L groups were inferior in improving renal tissues and colon tissues. Additionally, the PSP-H and PSP-M groups showed declining TNF- α and IL- 1β in the serum and colon tissues ($P < 0.05$) and dwindled protein expression of TNF- α and IL- 1β in the renal tissues ($P < 0.01$). No significant difference was observed in the PSP-L group. Compared with the normal control group, the model group showed increased abundance of Firmicutes and decreased abundance of Bacteroidetes. After PSP intervention, the abundance of Firmicutes was decreased, while that of Bacteroidetes was increased, and such changes were predominant in the PSP-H group. **Conclusion:** PSP can effectively alleviate renal injury, reduce the expression of inflammatory factors, regulate the structure of gut microbiota, and improve the damaged intestinal barrier of MN rats.

[Keywords] Plantaginis Semen; polysaccharides; membranous nephropathy; renal injury; gut microbiota

膜性肾病(MN)是以尿蛋白含量增加、血脂升高和肾小球基底膜增厚为主要特征的自身免疫性疾病,根据发病原因可分为原发性和继发性。在中国MN每年发病人数约为1400万,且MN患病人数逐年递增,已成为我国最为常见的慢性肾脏病之一^[1-3]。经研究发现,慢性肾病患者常因尿素增加而导致肠道菌群改变,并进一步加速肾损伤。另外,因肠道菌群失调可导致肾毒性代谢物增加,并激活局部和全身免疫反应,使慢性肾病患者长期处于慢性炎症状态,加速慢性肾病的发展进程^[4-5]。因此,肠道菌群的调节已经成为肾病防控的新方向。

车前子为车前科植物车前或平车前的干燥成熟种子,性甘、味寒,具有清热、利尿通淋、渗湿止泻的功效^[6]。目前临床用于治疗MN的肾炎灵胶囊、固本泄浊颗粒、完带汤各方中均含有车前子,其主要起清利湿热、利水化湿等作用^[7-10]。现代药理研究表明,车前子具有抗炎、抗氧化、利尿等活性,课题组研究发现车前子具有免疫调节作用,可有效改善MN大鼠肾组织损伤^[11-12],其中多糖为主要活性

物质。临床研究证实中药多糖可被肠道菌群分解利用,促进有益菌增殖,恢复菌群紊乱,缓解肠黏膜损伤,间接调节相应疾病,目前多糖介导肠道菌群治疗疾病也成为研究热点之一^[13-15],且车前子粗多糖胶囊在调节肠道微生态方面已被应用^[16]。但车前子多糖(PSP)通过改善肠道菌群而缓解肾损伤的关联性机制尚不明确。本文采用阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA)诱导MN大鼠模型,探讨PSP对MN大鼠肠道菌群多样性的影响,旨在从肠道微生态层面揭示PSP调节炎症因子与肠道菌群之间的关联性和治疗MN的作用机制及科学内涵,并为中药多糖治疗MN奠定理论基础。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性Wistar大鼠90只,8周龄,体质量180~200 g,由佳木斯大学实验动物中心提供,动物生产合格证号SCXK(黑)2016-003,动物房温度(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度(55 ± 10)%,12 h明暗交替。本研究经过佳木斯大学动物伦理委员会批准,审批号为jmsu-2019-0002-07。

1.2 药品和试剂 车前子(批号180503)购于佳木斯百草堂药店,质硬,气微,味淡,性状及外观符合2020年版《中华人民共和国药典》(一部)^[6],经佳木斯大学王丽红教授鉴定为车前科植物车前的干燥种子;弗氏不完全佐剂,天然牛血清白蛋白(美国Sigma公司,批号分别为F5506, A1933);碳化二亚胺盐酸盐(美国Aladdin生物试剂有限公司,批号E106172);无水乙二胺(天津市富宇精细化工有限公司,批号107-15-3);尿蛋白试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号C035-2-1);苏木素-伊红(HE)染色液(珠海贝索生物科技有限公司,批号EA50);过碘酸雪夫(PAS)染色液(北京雷根生物技术有限公司,批号DG0006);肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素(IL-1 β)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(深圳欣博盛生物科技有限公司,批号分别为EMC102a.96, EMC001b.96);兔抗多克隆抗体TNF- α , IL-1 β (北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为bs-10802R, bs-6319R);兔二步法检测试剂盒, DAB显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为PV-9001, ZLI-9017);PowerSoil[®] DNA试剂盒(美国MoBio公司,批号12888);TruSeq[®] Nano DNA LT Sample Prep Kit(美国Illumina公司,批号FC-121-4001)。

1.3 仪器 7105型黏附载玻片(江苏世泰实验器材有限公司);LXJ-II型离心沉淀机(上海医用分析仪器厂);磁力加热搅拌器(江苏南通兴仁电子分析仪器厂);Victor[™] X 3型多标记微孔板检测仪(美国PekinElmer公司);美国moticam 3000型显微摄影成像系统(美国Motic公司);PHS-3E型pH计(上海雷磁仪器厂);2135型切片机(德国莱卡公司);DYY-6C型电泳仪,2720型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国BG公司);NextSeq 500型Illumina Miseq高通量测序仪(美国Illumina公司)。

2 方法

2.1 车前子多糖的制备 称取干燥车前子1 kg,加入8倍量乙醇浸泡12 h,过滤,挥干乙醇,取药渣,阴干,加10倍量水,煎煮3次,每次2 h,合并滤液,减压浓缩,加乙醇使上清液浓度达85%,4℃静置12 h,3 500 r·min⁻¹离心5 min(离心半径8.4 cm),取沉淀加入蒸馏水复溶,减压浓缩,Sevag法除蛋白质^[17],糖溶液浓缩,冷冻干燥,得车前子多糖52.17 g。

2.2 膜性肾病大鼠模型的建立及考察 参照Border法^[18],制备C-BSA,PI>8.5即可。取C-BSA 80 mg溶于磷酸盐缓冲液(PBS) 15 mL中,与等量弗

氏不完全佐剂混合,超声乳化完全得预免疫试剂。取体质量180~200 g的雄性Wistar大鼠,适应性喂养1周后,用代谢笼收集24 h尿液并记录尿量,离心取上清液,用尿蛋白试剂盒检测24 h尿蛋白(UTP),取尿蛋白呈阴性的大鼠,随机分为正常组(15只)、造模组(75只)。造模组大鼠分别在腋窝和腹股沟区多点皮下注射,进行预免疫,每只大鼠注射0.3 mL,每点<0.05 mL,正常组注射一定比例PBS与弗氏不完全佐剂,隔天1次,共3次。将C-BSA溶于PBS 1 mL制作正式免疫试剂,预免疫1周后以尾静脉注射造模试剂,首次注射量为3.5 mg/只,隔日1次,每周3次,6周内缓慢将注射量递增至5 mg/只,第4周随机选取正常组和模型组大鼠各2只,检测24 h UTP并观察肾脏组织病理,当UTP>20 mg^[19],肾脏出现基底膜增厚、周围肾小管肿胀等病变^[20],确定MN造模成功。

2.3 分组及给药 2.2项下造模第4周开始,将造模成功大鼠按照随机数字法分为模型组,阳性药物组和车前子多糖高剂量组(PSP-H),中剂量组(PSP-M),低剂量组(PSP-L),每组均保留10只。根据大鼠和人的表面积比率换算等效剂量,PSP-H给药剂量为800 mg·kg⁻¹·d⁻¹(相当于生药量15 g·kg⁻¹),并以此按0.5, 0.25倍设定PSP-M(400 mg·kg⁻¹·d⁻¹)和PSP-L(200 mg·kg⁻¹·d⁻¹)给药剂量,阳性药物组给予盐酸贝那普利10 mg·kg⁻¹·d⁻¹,给药体积为10 mL·kg⁻¹。正常组和模型组给予等体积生理盐水,每日1次,连续4周。

2.4 MN大鼠病理学观察

2.4.1 肾组织病理学观察 第7周结束,将大鼠用20%乌拉坦(10 mL·kg⁻¹)腹腔注射麻醉,取肾脏,10%甲醛溶液固定,石蜡包埋,常规病理切片,进行PAS染色,光学显微镜下观察^[21]。

2.4.2 结肠组织病理学观察 收集结肠,用4%多聚甲醛固定24 h,脱水石蜡包埋,进行HE染色,光学显微镜下观察^[22]。

2.5 ELISA检测血清及结肠组织中的TNF- α , IL-1 β 含量 腹主动脉取血,离心得血清,收集结肠,按照ELISA试剂盒说明书分别检测血清和结肠组织中TNF- α 和IL-1 β 的含量^[23]。

2.6 免疫组化法检测肾脏中TNF- α , IL-1 β 蛋白表达影响 取大鼠肾脏皮质,制成切片,冷丙酮固定10 min,用PBS冲洗,加一抗后,37℃条件下孵化, PBS冲洗,与生物素标记的二抗在37℃下孵化2 h, DAB显色,封片,于显微镜下观察^[19]。

2.7 粪便基因组DNA的提取与检测 取大鼠肠道内容物,采用PowerSoil® DNA试剂盒提取肠道内容物DNA,用琼脂糖凝胶电泳判断分子大小,采用紫外分光光度法对DNA进行定量后,取适量DNA于离心管中,稀释,根据引物序列进行聚合酶链反应(PCR)扩增,扩增区域为16S rRNA基因的V3~V4高变区域。使用TruSeq® DNA无PCR样品制备试剂盒构建文库,以进行Qubit定量和文库检测。使用Illumina MiSeq/NovaSeq平台对文库进行测序^[24]。引物序列见表1。

表1 V3+V4区引物序列

Table 1 Sequence of primer for V3+V4

项目	引物序列(5'-3')	扩增长度/bp
V3+V4	上游 ACTCCTACGGGAGGCAGCA	341-806
	下游 GGACTACHVGGGTWTCTAAT	

2.8 统计学分析 采用SPSS 20.0软件对数据进行统计分析,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间参数采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

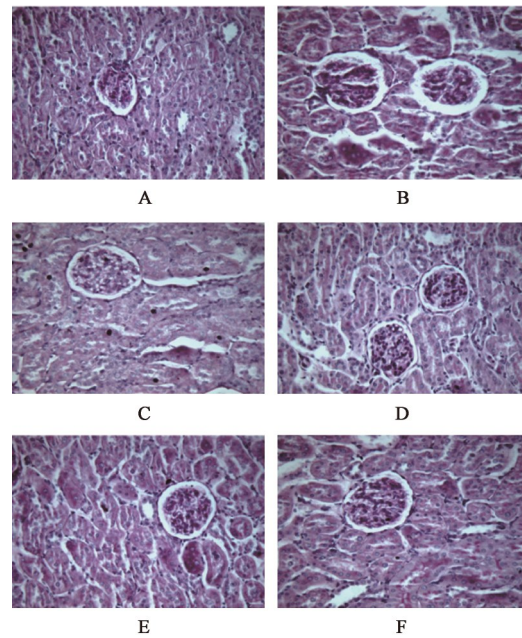
3.1 对MN大鼠肾脏病理改变的影响 与正常组比较,模型组大鼠肾小球体积增大,肾小球基底膜明显增厚并出现皱褶感,由单层变为多层,且空泡变性,周围肾小管肿胀,部分变性坏死。与模型组比较,盐酸贝那普利组,PSP-H肾小球囊腔减小,肾小球结构模糊,基膜增厚程度减轻,部分肾小管变性且肿胀程度得到改善,PSP-M,PSP-L肾小管肿胀程度也较为明显,说明PSP可减轻肾组织损伤,实验中以 $800 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 给药剂量效果最佳。见图1。

3.2 对MN大鼠结肠组织病理变化的影响 与正常组比较,模型组大鼠肠黏膜上皮细胞受损甚至凋亡,杯状细胞和肠腺减少。与模型组比较,盐酸贝那普利组,PSP-H大鼠结肠组织中黏膜排列较整齐,黏膜上皮轻度肿胀,腺体萎缩改善显著,PSP-M,PSP-L组大鼠肠组织黏膜上皮仍可见肿胀,说明PSP可减轻结肠组织损伤,实验中以 $800 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 给药剂量效果最佳。见图2。

3.3 对MN大鼠血清中TNF- α , IL-1 β 含量的影响

与正常组比较,模型组大鼠血清中TNF- α , IL-1 β 的含量均明显升高($P < 0.05$)。与模型组比较,盐酸贝那普利组和PSP-H, PSP-M大鼠血清中TNF- α , IL-1 β 含量均明显降低($P < 0.05$)。见表2。

3.4 对MN大鼠结肠组织中TNF- α , IL-1 β 含量的影响 与正常组比较,模型组大鼠结肠组织中TNF- α ,



A. 正常组; B. 模型组; C. 盐酸贝那普利组; D. PSP-H; E. PSP-M; F. PSP-L(图2~4同)

图1 PSP对MN大鼠肾脏病理改变的影响(PAS, $\times 400$)

Fig. 1 Effect of PSP on renal pathological changes in MN rats (PAS, $\times 400$)

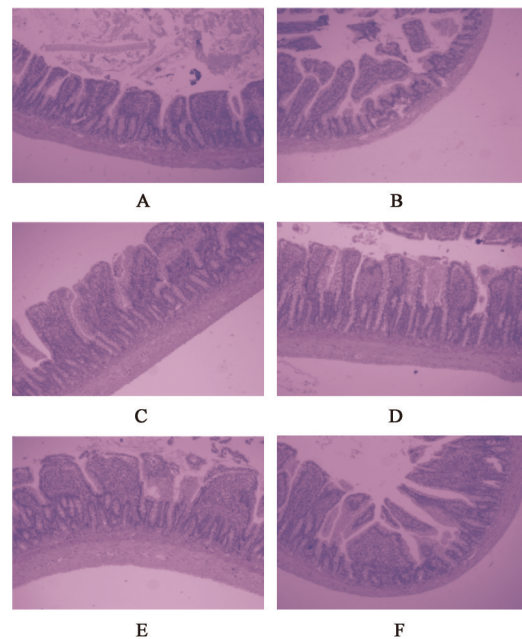


图2 PSP对MN大鼠结肠组织病理变化的影响(HE, $\times 40$)

Fig. 2 Effect of PSP on pathological changes of colon tissue in MN rats (HE, $\times 40$)

IL-1 β 含量均明显升高($P < 0.05$)。与模型组比较,盐酸贝那普利组和PSP-H, PSP-M大鼠结肠组织中TNF- α , IL-1 β 含量明显下降($P < 0.05$)。见表3。

3.5 对MN大鼠肾组织中TNF- α , IL-1 β 蛋白表达影响 与正常组比较,模型组大鼠肾脏组织中TNF- α ,

表 2 PSP 对 MN 大鼠血清中炎症因子含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of PSP on content of inflammatory factor in serum of MN rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TNF- α	IL-1 β
正常		64.50±3.03	355.10±30.11
模型		374.50±29.48 ¹⁾	650.00±60.55 ¹⁾
盐酸贝那普利	10	169.80±16.29 ³⁾	428.30±29.44 ³⁾
PSP	800	179.50±17.46 ³⁾	436.50±27.75 ³⁾
	400	184.10±18.29 ³⁾	462.00±38.82 ³⁾
	200	357.40±22.39	609.16±34.96

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 3~4,6~7 同)。

表 3 PSP 对 MN 大鼠结肠中炎症因子含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effect of PSP on content of inflammatory factor in colonic homogenate of MN rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TNF- α	IL-1 β
正常		2.02±0.15	7.48±0.53
模型		4.78±0.18 ¹⁾	14.15±3.04 ¹⁾
盐酸贝那普利	10	3.10±0.30 ³⁾	11.60±0.66 ³⁾
PSP	800	3.21±0.16 ³⁾	11.91±0.69 ³⁾
	400	3.42±0.07 ³⁾	12.43±0.48 ³⁾
	200	4.51±0.38	13.82±0.60

IL-1 β 蛋白表达水平显著增强 ($P<0.01$)。与模型组比较,除 PSP-L 外,各给药组的 TNF- α , IL-1 β 表达水平均显著降低 ($P<0.01$)。见表 4,图 3~4。

表 4 PSP 对 MN 大鼠肾组织中 TNF- α , IL-1 β 蛋白表达影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Effect of PSP on expression of TNF- α and IL-1 β protein in renal tissue of rats with MN ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	积分吸光度 IA	
		TNF- α	IL-1 β
正常		913.33±77.89	9 816.67±1 357.08
模型		4 366.67±436.65 ²⁾	67 500.00±5 753.26 ²⁾
盐酸贝那普利	10	1 338.33±288.40 ⁴⁾	33 583.33±3 006.94 ⁴⁾
PSP	800	1 875.00±189.08 ⁴⁾	38 166.67±2 483.28 ⁴⁾
	400	2 400.00±485.80 ⁴⁾	49 833.33±7 494.44 ⁴⁾
	200	3 986.67±318.47	62 166.67±6 794.61

3.6 运算分类单位 (OTU) 划分和分类地位鉴定使用 Illumina MiSeq/NovaSeq 平台进行序列检测。经科学计数法显示,所有样品共产生 1 093 136 条序列,优化后得到 900 882 条有效序列,其中正常组的去低质量序列和有效序列均最高,随 PSP 剂量的升高,去低质量序列和有效序列呈升高趋势,说明 PSP

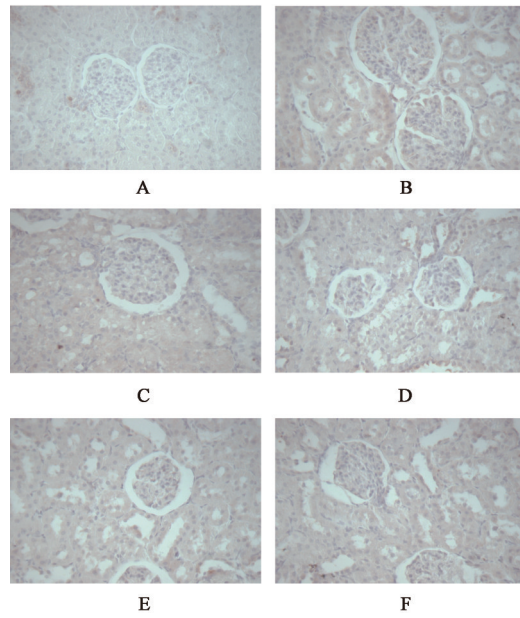


图 3 PSP 对 MN 大鼠肾组织 TNF- α 蛋白表达影响 (免疫组化, $\times 400$)

Fig. 3 Effect of PSP on protein expression of TNF- α in rats with MN (IHC, $\times 400$)

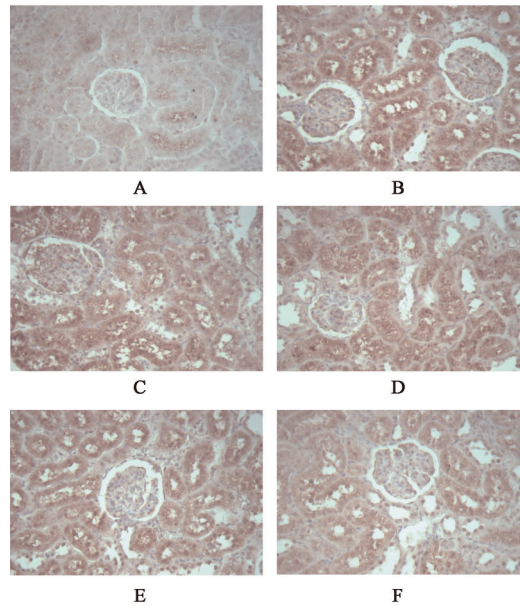


图 4 PSP 对 MN 大鼠肾组织中 IL-1 β 蛋白表达影响 (免疫组化, $\times 400$)

Fig. 4 Effect of PSP on protein expression of IL-1 β in rats with MN (IHC, $\times 400$)

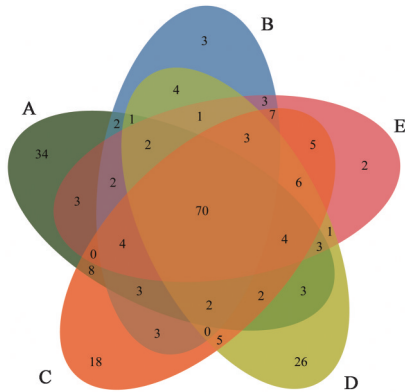
可有效改善肠道菌群的质量且呈剂量相关,见表 5。通常将相似度大于 97% 以上的序列聚集为一个 OTU。并用 Venn 图来分析 6 个样本中特有或共有的 OTU 数目,通过交叉环来表示,可以较为直观的反映出各样本之间共同或独有的部分。所有样品共产生 642 个 OTU,各组产生 OTU 的数量分别为 143(正常组),110(模型组),140(PSP-H),133(PSP-

M), 116(PSP-L)。见图5。

表5 肠道菌群质量评估

Table 5 Intestinal microbiota quality assessment

Sample ID	正常组	模型组	PSP-H	PSP-M	PSP-L
Input Sequence	275 181	162 592	259 454	220 187	175 722
Filtered Sequence	242 018	130 504	224 168	197 405	136 175
Valid Sequence	236 002	128 479	209 118	194 921	132 362



A. 正常组; B. 模型组; C. PSP-H; D. PSP-M; E. PSP-L(图6, 7同)

图5 大鼠肠道菌群OTU水平上的Venn

Fig. 5 Venn diagram on the OTU level of rat gut microbiota

3.7 Alpha多样性指数分析 Chao1和Shannon指数用来反应样本中物种丰富度和多样性^[25]。与正常组比较,模型组的物种丰富度下降,给予PSP干预后,物种丰富度和多样性上升,其中PSP-H物种丰富度和多样性与正常组相近。证明PSP-H可以改善MN大鼠肠道菌群组成,使MN大鼠肠道菌群结构趋近正常状态。见表6。

表6 PSP对物种多样性和丰富度的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 6 Effect of PSP on diversity and richness of species ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Chao 1	Shannon
正常		1 109.67±33.71	7.60±0.41
模型		733.78±24.83 ²⁾	5.67±0.28 ²⁾
PSP	800	1 013.56±83.21 ⁴⁾	6.82±0.14 ⁴⁾
	400	853.25±31.88 ⁴⁾	6.70±0.12 ⁴⁾
	200	786.16±22.32	6.44±0.07 ³⁾

3.8 肠道菌群结构分析

3.8.1 肠道菌群在门水平上的结构分析 从门水平上分析,正常组和模型组中所含的主要细菌门差异较大,结果见图6。按各细菌门差异大小由大到小排序,主要为厚壁菌门(Firmicutes),拟杆菌门(Bacteroidetes),变形杆菌门(Proteobacteria)等,经PSP干预,厚壁菌门占比减小,拟杆菌门和变形杆菌

门占比增加,且与剂量呈正相关。表明PSP可调节MN大鼠肠道中厚壁菌门、拟杆菌门和变形杆菌门相对丰度,调整肠道菌群结构,从而抑制炎症因子释放。

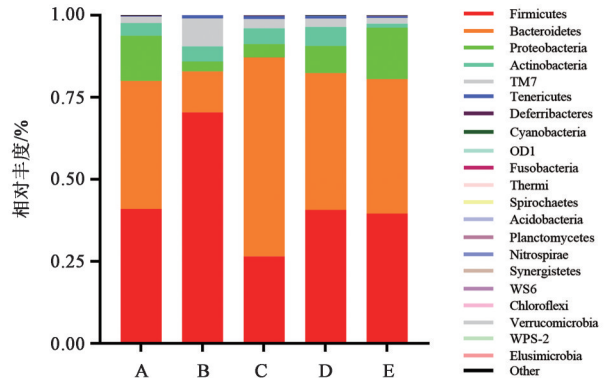


图6 不同处理组门水平的微生物结构

Fig. 6 Microbial structure at phylum level in different treatment groups

3.8.2 肠道菌群在属水平上的结构分析 从属水平上分析,正常组与模型组相差较大的属有S24-7,拟杆菌属(Odoribacteraceae)和毛旋螺菌属(Lachnospiraceae),其中S24-7和拟杆菌属为模型组和正常组的优势菌属,在给予PSP后,S24-7,拟杆菌属相对丰度有所提高。见图7。

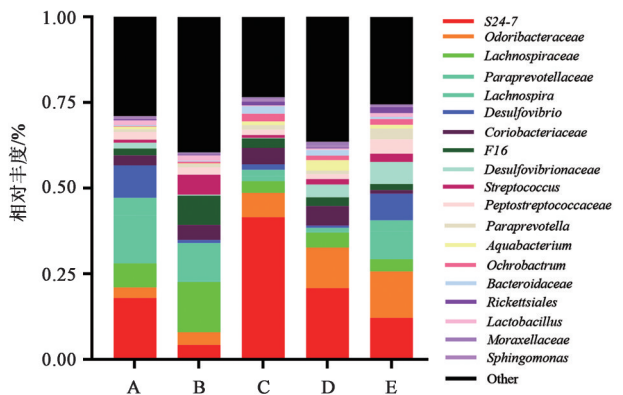


图7 不同处理组属水平的微生物结构

Fig. 7 Microbial structure at genus level in different treatment groups

3.9 PSP对大鼠肠道差异菌群的影响 拟杆菌门与厚壁菌门比值(B/F)是反应肠道菌群紊乱的重要指标。在门水平上,与正常组比较,模型组大鼠B/F明显降低($P<0.05$)。与模型组比较,PSP-H和PSP-M组B/F明显升高($P<0.05$)。见表7。

4 讨论

膜性肾病是以肾小球基底膜增厚并伴随免疫复合物沉积为主要特征的肾脏疾病,其发病机制目

表7 PSP对MN大鼠肠道B/F值的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 7 Effect of PSP on B/F ratio in rat ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	B/F
正常		0.95±0.002 9
模型		0.18±0.004 7 ¹⁾
PSP	800	2.29±0.015 0 ³⁾
	400	1.03±0.006 1 ³⁾
	200	1.04±0.005 9

前尚不清楚,但大多数专家认为,其主要与免疫机制异常有关^[26-27]。现代研究表明,肠道菌群失调引起的免疫功能障碍对慢性肾病的发生发展起促进作用^[27]。在2011年,Meijers B K等首次提出“肠-肾轴”的概念,其核心观点为肾脏疾病可引起肠道菌群失调及肠道屏障功能受损,同时肠道菌群紊乱会使益生菌减少,并进一步引发全身性炎症,加速肾脏疾病发展形成恶性循环^[28-29]。因此,维持肠道屏障的完整性是预防和治疗慢性肾脏病的重要方向。本文从肠道菌群平衡的角度探讨PSP治疗MN的作用机制,将为“肠-肾轴”的调控应用奠定理论基础。

近年研究证明,中医药能够提高MN的临床疗效,减少长期服用西药带来的副作用,受到研究者青睐。中医将MN归属于“水肿”“尿浊”等范畴,因此在MN的发生和发展过程中,中医常选用健脾补肾、清热除湿、活血益气、化瘀通淋的中药进行治疗,且效果显著^[30]。现代药理研究表明,中药多糖具有调节免疫、抗炎、保护肾脏、促进益生元生长、调节肠道微环境等作用^[31-33]。本课题组前期已证明车前子多糖对MN具有较好治疗作用^[18]。为进一步阐明PSP对MN的作用机制,本实验以肠道菌群调节为切入点,探究PSP对MN大鼠肠道菌群的影响。研究表明,给予PSP后,肾小球基底膜增厚程度减轻,结肠组织中黏膜排列较整齐,血清及结肠组织中TNF- α , IL-1 β 含量降低,肾组织中TNF- α , IL-1 β 蛋白表达减少,肠道中有害菌丰度降低,且实验中以800 mg·kg⁻¹·d⁻¹给药剂量时通过肠道菌群改善MN的效果最为显著,可能与PSP调节肠道菌群结构、恢复受损肠道屏障和抑制TNF- α , IL-1 β 表达有关。

本文采用16S rRNA基因测序MN大鼠肠道菌群变化,结果表明门水平下,模型组大鼠肠道菌群中Firmicutes丰度上升,Bacteroidetes丰度下降,经给药干预后,MN大鼠体内Bacteroidetes相对丰度显著提高。Bacteroidetes可以将植物糖类物质分解为益

生元,减轻机体炎症^[34-36]。肾脏功能受损会引起炎症因子分泌、免疫系统失调、肠上皮细胞屏障功能受损^[26]。本文发现肠道菌群紊乱能促进结肠组织分泌TNF- α , IL-1 β ,且与血清中TNF- α , IL-1 β 的变化趋势一致。因此,本结果可初步证明MN大鼠的肠道菌群失调与其所处炎症微环境密切相关。研究证实,B/F上升可以直接影响肠道菌群对膳食纤维的代谢,使短链脂肪酸(SCFAs)浓度升高,SCFAs可以诱导大鼠肠道中调节性T细胞产生和分化,从而促进抑炎细胞因子IL-10产生,发挥抗炎作用^[37-39],本文研究结果表明,PSP可使大鼠肠道菌群中B/F值上升,从而抑制炎症因子释放,可调节MN大鼠菌群结构并改善肾损伤。

综上所述,车前子多糖可减轻MN大鼠肾组织和结肠组织的病理损伤,减少炎症因子释放,改善MN大鼠肠道菌群失调。上述作用可能与其下调肾脏组织及结肠组织中促炎因子的表达和短链脂肪酸含量促进调节细胞(Tregs)细胞表达抑炎因子有关。本文初步证实车前子多糖治疗MN与肠道菌群的关联性机制,可为基于“肠-肾轴”的PSP抗膜性肾病的深入机制研究提供理论依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 杜昕,袁国栋,刘明,等. 加味升降散对膜性肾病大鼠肾保护作用及对肾组织线粒体活性氧表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(12): 97-103.
- [2] 张小娟. 单中心肾脏病理谱分析及他克莫司治疗原发性膜性肾病的研究[D]. 济南: 山东大学, 2019.
- [3] 蔡倩,王志英,郭晓媛,等. 扶正祛风方治疗特发性膜性肾病的临床观察[J]. 世界中医药, 2020, 15(21): 3299-3303.
- [4] HOBBY G P, KARADUTA O, DUSIO G F, et al. Chronic kidney disease and the gut microbiome[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2019, 316(6): 1211-1217.
- [5] 黄志敏,黄仁发,唐宇,等. 基于肠肾轴理论探讨三七注射液对CKD大鼠肠粘膜功能和肠道菌群的影响[J/OL]. 中华中医药学刊: 1-14[2021-09-27]. <http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20210205.1604.008.html>.
- [6] 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: 68-69.
- [7] 温志歌,丁齐义,王蕾. 车前子的临床应用及其用量探究[J]. 长春中医药大学学报, 2021, 37(1): 32-35.
- [8] 王友富,孟昭君,时元林,等. 肾炎灵胶囊治疗气虚水

- 肿临床研究[J]. 河南中医, 2004, 24(2): 36-38.
- [9] 王延辉, 沈蓓莉, 曲青山, 等. 固本泄浊颗粒治疗特发性膜性肾病气虚湿阻证临床观察[J]. 中医学报, 2018, 33(5): 882-886.
- [10] 朱荣宽, 郭建军, 王新丽. 完带汤治疗特发性膜性肾病30例[J]. 光明中医, 2017, 32(10): 1447-1450.
- [11] 刘颖斐, 王秋红, 赵宏, 等. 车前子多糖治疗大鼠膜性肾病的实验探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(22): 103-107.
- [12] 赵宏, 李洋, 柴桂芳, 等. 车前子不同炮制品抗大鼠膜性肾病的比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(15): 125-131.
- [13] 唐圆, 谢果珍. 多糖与肠道菌群的相互作用研究进展[J]. 现代农业科技, 2020, 9: 225-227.
- [14] 周欣, 付志飞, 谢燕, 等. 中药多糖对肠道菌群作用的研究进展[J]. 中成药, 2019, 41(3): 623-627.
- [15] 吴钰焯, 谢瑞智, 林粤, 等. 中药多糖与肠道菌群相互作用研究进展[J]. 实用中医药杂志, 2020, 36(3): 407-409.
- [16] 马玉坤. 车前子粗多糖胶囊调节肠道菌群微生态干预老年慢性阻塞性肺疾病稳定期的临床研究[D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2019.
- [17] 景永帅, 张丹参, 吴兰芳, 等. 远志多糖的分离纯化、结构特征及生物活性[J]. 食品科学, 2017, 38(17): 126-131.
- [18] 柴桂芳. 车前子性味拆分组分治疗膜性肾炎的药理作用研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2015.
- [19] 陈文军, 陈素枝, 靳晓华, 等. 降脂通络软胶囊对膜性肾病大鼠肾保护作用及对肾组织 Bcl-2 和 Bad 表达的影响[J]. 中草药, 2016, 47(18): 3263-3268.
- [20] 王玉洁, 曹灵, 胡承刚, 等. 川芎嗪对膜性肾病的防治作用及对内质网应激的拮抗[J]. 中药材, 2021, doi: 10.13863/j.issn1001-4454.2021.05.033.
- [21] 陈素枝, 陈文军, 张卓, 等. 丹参多酚酸盐对阳离子化牛血清白蛋白致膜性肾病大鼠的影响[J]. 中草药, 2018, 49(8): 1877-1883.
- [22] 陈健, 张梁坤, 谷文超, 等. 半夏泻心汤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]. 中国中药杂志, 2021, 46(11): 2871-2880.
- [23] 李得堂, 涂星, 柴玉娜, 等. 腹泻型肠易激综合征模型大鼠海马与结肠组织中细胞因子的含量变化及 mRNA 的表达[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(10): 128-132.
- [24] ZHU L, SHA L, LI K, et al. Dietary flaxseed oil rich in omega-3 suppresses severity of type 2 diabetes mellitus via anti-inflammation and modulating gut microbiota in rats[J]. *Lipids Health Dis*, 2020, 19(1): 20.
- [25] 王平, 赵澄, 卢芳国, 等. A 型流感病毒对小鼠肺部菌群及趋化因子 CCL5 和 CXCL10 的影响及麻杏石甘汤干预作用研究[J]. 中草药, 2020, 51(21): 5523-5537.
- [26] 王晔, 高宏宇, 张莉. 沙利度胺对膜性肾病大鼠炎症的抑制作用及其机制分析[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2020, 21(8): 673-676, 753.
- [27] LANG R, WANG X, LIANG Y, et al. Research progress in the treatment of idiopathic membranous nephropathy using traditional Chinese medicine[J]. *J Transl Int Med*, 2020, 8(1): 3-8.
- [28] LANG R, WANG X H, LI A F, et al. Effects of Jian Pi Qu Shi formula on intestinal bacterial flora in patients with idiopathic membranous nephropathy: a prospective randomized controlled trial[J]. *Chronic Dis Transl Med*, 2020, 6(2): 124-133.
- [29] 李昭君, 陈晓光, 张森. 肠道菌群-代谢物网络同慢性肾病发生发展的关系及其关联机制研究进展[J]. 药科学报, 2020, 55(12): 2777-2784.
- [30] MEIJERS B K, EVENEPOEL P. The gut-kidney axis: indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate and CKD progression[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26(3): 759-761.
- [31] LANG R, WANG X, LIANG Y, et al. Research progress in the treatment of idiopathic membranous nephropathy using traditional Chinese medicine[J]. *Transl Int Med*, 2020, 8(1): 3-8.
- [32] 表明, 杨洪涛. 从肠道微生态看中医肾病学的发展机遇[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(6): 2336-2341.
- [33] 田雨, 丁艳平, 邵宝平, 等. 黄芪等药食同源类中药作为功能性食品与肠道菌群的相互作用[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(11): 2486-2492.
- [34] 张俊杰, 张淑静, 董瑞娟, 等. 高通量测序研究中药经方对正常小鼠肠道菌群的影响[J]. 世界中医药, 2019, 14(5): 1123-1132, 1138.
- [35] CAPORASO J G, LAUBER C L, COSTELLO E K, et al. Moving pictures of the human microbiome[J]. *Genome Biol*, 2011, 12(5): 50.
- [36] GOULET O. Potential role of the intestinal microbiota in programming health and disease[J]. *Nutr Rev*, 2015, 73(1): 32-40.
- [37] 王平, 赵澄, 卢芳国, 等. 麻杏石甘汤对流感病毒感染小鼠肠道菌群及趋化因子 CCL5、CXCL10 的影响[J]. 中草药, 2021, 52(1): 160-175.
- [38] 俞昊男, 刘志华. 肠道微生物与黏膜免疫研究的前沿进展[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(16): 1921-1930.
- [39] 戴新新, 蔡红蝶, 宿树兰, 等. 地黄叶对糖尿病肾病大鼠肠道菌群的调节作用[J]. 药科学报, 2017, 52(11): 1683-1691.

[责任编辑 周冰冰]