

基于16S rRNA测序的肠道菌群探讨化浊解毒活血通络方对 脑缺血再灌注损伤大鼠脑-肠轴的影响

霍瑞卿¹, 赵敏菡¹, 李芳钊¹, 韩宇帆¹, 孙阔¹, 田军彪^{2*}

(1. 河北中医学院, 石家庄 050200; 2. 河北省中医院, 石家庄 050011)

[摘要] 目的:研究化浊解毒活血通络方对脑缺血再灌注损伤大鼠肠道菌群的影响,探讨中药调控肠道微生物群进而恢复脑-肠轴平衡的机制。方法:将50只SPF级雄性SD大鼠随机分为假手术组,模型组,化浊解毒活血通络方高(25.0 g·kg⁻¹),中(12.5 g·kg⁻¹),低(6.25 g·kg⁻¹)剂量组,每组10只。参照Longa法并结合既往研究经验制备大鼠中动脉梗塞大鼠模型,缺血2 h后再灌注。于脑缺血再灌注损伤72 h检测大鼠神经功能缺损情况、脑梗死范围百分比;采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测大鼠结肠闭锁小带蛋白-1(ZO-1),闭锁蛋白(Occludin) mRNA表达;苏木素-伊红(HE)染色观察各组大鼠肠道组织、脑组织损伤程度;每组收集6只大鼠粪便进行16S rRNA测序;免疫组化、酶联免疫吸附测定试验(ELISA)检测肠道组织、外周血、脑组织调节性T细胞(Treg),辅助性T细胞17(Th17)的表达。结果:与假手术组比较,模型组大鼠神经功能缺损症状加重($P<0.05$),脑梗死面积增加($P<0.05$);与模型组比较,化浊解毒活血通络方高、中剂量组大鼠神经功能缺损症状明显减轻($P<0.05$),脑梗死面积减少($P<0.05$)。与假手术组比较,模型组大鼠结肠黏膜结构破坏,上皮细胞、杯状细胞结构不完整;与模型比较,化浊解毒活血通络方高、中剂量组大鼠结肠黏膜破坏较少,上皮细胞、杯状细胞结构完整。与假手术组比较,模型组大鼠Occludin,ZO-1 mRNA表达降低($P<0.05$),与模型组比较,化浊解毒活血通络方高剂量组Occludin,ZO-1 mRNA水平有所增加($P<0.05$)。模型组与假手术组肠道菌群生态结构存在差异,化浊解毒活血通络方高剂量组与假手术组群落结果更相近。与假手术组比较,模型组大鼠肠道组织、外周血、脑组织Treg细胞表达下降,Th17细胞表达升高($P<0.05$);与模型比较,化浊解毒活血通络方高、中剂量组大鼠肠道组织、外周血、脑组织Treg细胞表达升高,Th17细胞表达下降($P<0.05$)。结论:化浊解毒活血通络方可能通过调整肠道微生物的丰度和多样性,改善肠壁通透性,减少肠道Th17细胞迁移至缺血侧脑组织,减少炎症反应,进而减轻大鼠脑缺血再灌注损伤。

[关键词] 化浊解毒活血通络方; 脑缺血再灌注损伤; 肠道菌群; 16S rRNA; 肠道屏障

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R287;R743.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)01-0121-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220194

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211109.1455.006.html>

[网络出版日期] 2021-11-09 16:04

Effect of Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo Prescription on Brain-gut Axis of Rats with Cerebral Ischemia-reperfusion Injury Based on 16S rRNA Sequencing of Intestinal Flora

HUO Rui-qing¹, ZHAO Min-han¹, LI Fang-zhao¹, HAN Yu-fan¹, SUN Kuo¹, TIAN Jun-biao^{2*}

(1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China;

2. Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo (HJHT) prescription on the intestinal flora in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury, and to explore the mechanism of Chinese medicinal prescription regulating intestinal flora to restore the balance of brain-gut axis. **Method:** Fifty male

[收稿日期] 20210316(004)

[基金项目] 河北中医药管理局科研计划项目(2020119);河北中医学院科研能力提升一般项目(KTY2019013);河北中医学院科研能力提升重点项目(KTZ2019028)

[第一作者] 霍瑞卿,在读博士,从事中西医结合脑血管病研究,E-mail:1194802840@qq.com

[通信作者] * 田军彪,博士,从事中西医结合脑血管病研究,E-mail:jbt1965@sina.com

SPF SD rats were randomly assigned into sham group, model group, high-dose HJHT group ($25.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), medium-dose HJHT group ($12.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and low-dose HJHT group ($6.25 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), with 10 rats in each group. The rat model of permanent middle cerebral artery infarction was established according to Longa method and previous research experience, and reperfusion was performed 2 h after ischemia. The recovery of neurological function deficit and the percentage of cerebral infarction area were detected 72 h after administration. Real-time PCR was performed to detect the mRNA levels of Occludin and zonula occludens-1 (ZO-1) in rat colon. Hematoxylin-eosin (HE) staining was conducted to reveal the intestinal damage. The feces of 6 rats in each group were collected for 16S rRNA sequencing. The expression of Treg and Th17 in intestinal tissue, peripheral blood, and brain tissue were detected. **Result:** Compared with the sham group, the model group showed obvious neurological deficit ($P<0.05$) and large cerebral infarction area ($P<0.05$). High-dose and medium-doses HJHT alleviated the symptoms of neurological impairment ($P<0.05$) and reduce the cerebral infarction area ($P<0.05$) compared with the model group. Compared with the sham group, the model group showed destroyed structure of colonic mucosa and incomplete epithelial cells and goblet cells, while high-dose and medium-doses HJHT alleviated such changes. The mRNA levels of Occludin and ZO-1 in the model group were lower than those in the sham group ($P<0.05$), and the high-dose HJHT groups were higher than the model group ($P<0.05$). The intestinal flora structure was significantly different between the model group and the sham group while similar between the high-dose HJHT group and sham group. Compared with the sham group, the model group showed down-regulated expression of Treg and up-regulated expression of Th17 in the intestinal tissue, peripheral blood, and brain tissue, and high-dose and medium-dose HJHT alleviated the changes in the expression of Treg and Th17 in the model group ($P<0.05$). **Conclusion:** Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo prescription may improve the permeability of intestinal wall by adjusting the abundance and diversity of intestinal microorganisms to reduce the migration of intestinal Th17 cells toward the ischemic lateral brain tissue, mitigate the inflammatory response, and thus alleviate the cerebral ischemia-reperfusion injury in rats.

[Keywords] Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo prescription; cerebral ischemia-reperfusion injury; intestinal flora; 16S rRNA; intestinal barrier

据世界卫生组织宣布,脑血管意外是世界上第二大死因,也是全球第三大致残原因,缺血性卒中约占卒中总数的70%~80%^[1]。脑卒中最严重的原因是脑中动脉闭塞(MCAO),导致受影响的脑组织损伤,损伤后引发炎症和免疫反应^[2]。脑卒中后炎症反应是缺血性脑损伤的一个持久的病理过程,是继发性脑损伤的重要原因^[3]。这一过程与脑卒中后肠道微生物失衡和肠道屏障破坏密切相关^[4-5]。急性脑损伤导致微生物组失调,反之,肠道微生物组的变化亦影响脑损伤后的神经炎症和神经功能^[6]。肠道微生物群是启动脑损伤继发性神经炎症反应的关键调节器,微生物对免疫和脑卒中预后的影响是通过微生物多样性的改变导致肠道屏障受损,肠道炎症细胞迁移至脑产生的^[7-8]。T细胞在脑缺血后继发性神经炎症中起决定性作用^[9-10]。多项证据表明,肠道微生物群是T细胞稳态的关键调节因子,并参与免疫系统的成熟及维持宿主和微生物的相互共存。研究发现,卒中后肠道菌群失调导致

肠道免疫细胞转位至大脑增加缺血区炎症反应,加重脑缺血损伤^[11-12]。BENAKIS等^[6]研究发现,使用抗生素预处理抑制肠道菌群,MCAO小鼠在第3天时,肠道菌群 α -多样性明显下降,脑梗死体积减小,预后较好,导致这种现象的机制可能是小肠内分泌白细胞介素-17(IL-17)的 $\gamma\delta$ T细胞数目减少,调节性T细胞(Treg)数量增加,调节T细胞抑制IL-17⁺ $\gamma\delta$ T细胞迁移至脑膜,减轻脑组织炎症^[6]。因此,对缺血性卒中后失衡的肠道微生态进行调节,对于缺血性卒中的康复预后,减少其致残致死的发生机率有着重要的意义^[13]。

卒中后湿热痰瘀等浊毒闭阻肠道,腑气不通反而上逆,导致浊毒闭阻脑络,气血瘀滞,脉络不通。化浊解毒活血通络法在此理论上提出。课题组前期研究发现,脑缺血后血脑屏障通透性增加,化浊解毒活血通络方可通过上调缺血区域脑组织紧密连接蛋白闭锁小带蛋白-1(ZO-1),闭锁蛋白(Occludin)的表达降低血脑屏障的通透性,并通过

减少炎症细胞因子的表达,降低脑缺血再灌注损伤(CIRI)的程度^[14-15]。在前期实验研究基础上,本实验旨在研究化浊解毒活血通络方是否通过调节肠道菌群,改善肠道屏障通透性,减少肠道炎症细胞从肠道随血液循环透过损伤后的血脑屏障迁移至脑组织,从而减轻CIRI,发挥神经保护作用。

1 材料

1.1 动物 健康成年雄性SD大鼠50只,体质量250~280 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号SCXK-(京)2016-0006。所有动物饲养在河北中医学院动物房清洁级环境内,室温控制在21~25℃,自由取食水。随机将动物分为假手术组,模型组,化浊解毒活血通络方高、中、低剂量组共5组,每组10只。动物实验研究经由河北中医学院动物伦理委员会批准,伦理审查编号DWLL2018047。

1.2 药物 化浊解毒活血通络方(组方为黄连6 g,茯苓15 g,泽泻6 g,丹参15 g,赤芍15 g,当归9 g,石菖蒲15 g,郁金15 g,川芎9 g,地龙15 g,为广东一方制药有限公司生产的配方颗粒,批号分别为0071783, 0092923, 0081833, 0071563, 0060823, 0070963, 0061663, 0072803, 0086363, 0057083)。

1.3 试剂 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染液(北京索莱宝科技有限公司,批号G3005);IL-17, IL-10酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒,叉头框蛋白3(FoxP3)一抗,IL-17一抗(武汉云克隆公司,批号分别为SEA063Ra, SEA056Ra, PAB877Ra01, PAA063Ra01);PE/Cyanine7抗鼠CD4抗体,APC抗鼠CD25抗体,Alexa Fluor® 488抗小鼠/大鼠/人FoxP3抗体[BioLegend(北京)生物科技有限公司,批号分别为201515, 202113, 320011];IL-17A单克隆抗体(美国eBioscience公司,批号11-7177-80);RIPA裂解液(碧云天生物技术有限公司,批号P0013E);发光试剂盒(美国Millipore公司,批号WBKLS0500);硝酸纤维素(NC)膜(美国Pall Corporation公司,批号T22740);山羊抗兔二抗(北京中杉金桥公司,批号ZB2301);焦碳酸二乙酯(DEPC,美国Sigma公司,批号D5758);Estep Super Total RNA Extraction Kit, GoScript Reverse Transcription System, GoTaq qPCR Master Mix(北京Promega公司,批号分别为LS1040, A5001, A6002);引物[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号260064816];microAmp Optical 8-Cap Strip, MicroAmp Fast Reaction Tubes(美国Life

Technologies公司,批号分别为REF4323032, REF4358293)。

1.4 仪器 SHA-B型恒温振荡器(常州国华公司);DL-CJ-1N型高性能无菌实验台(哈尔滨东联公司);YXQ-LS-50A型高压灭菌器(上海博迅实业有限公司);2720型基因扩增仪(美国AB公司);1-15K型高速冷冻离心机(美国Sigma公司);756MC型紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);CFX96型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 造模及给药 用改良线栓法建立CIRI模型。大鼠使用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,仰卧位固定。颈正中线切口,钝性分离右侧颈总动脉(CCA),颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA),分别于CCA, ICA, ECA穿线备用。结扎CCA近心端,在ECA近分叉处剪一倒“V”小口,插入线栓,于插入线栓处将备用线结扎,固定线栓,缓慢推送线栓至ICA,当线端进入1.8 cm左右感觉有一定阻力时停止推进,此时线栓头端正好位于大脑中动脉(MCA)起始部,即造成阻断。缺血2 h后拔出线栓,即制成CIRI模型。采用Longa五分法在模型大鼠术后苏醒进行早期评分,评分>1分即可从神经缺损评分角度认为模型制备成功。同时,每组选取3只进行TTC染色,经TTC染色后,正常脑组织呈现为红色,梗死区脑组织呈现为白色,则为造模成功。

各实验组分别于拔栓大鼠苏醒后给药,造模成功后,假手术组及模型组均按照10 mL·kg⁻¹体积给予蒸馏水灌胃;化浊解毒活血通络方高、中、低剂量组分别给予相应剂量的中药溶液灌胃,按照成人等效剂量折算系数,以成人剂量的6.25倍为中剂量,化浊解毒活血通络方低、中、高各给药剂量为6.25, 12.5, 25.0 g·kg⁻¹,给药前均用蒸馏水制备成不同浓度的中药混悬液,按照10 mL·kg⁻¹体积灌胃,连续3 d。

2.2 神经功能评分 大鼠于脑缺血再灌注72 h后,采用改良版神经功能评分进行大鼠神经行为学评分。

2.3 脑梗死范围百分比测定 大鼠灌胃给药3 d后麻醉,断头取脑,生理盐水冲洗残血,-20℃下速冻20 min,置于脑槽中切片,TTC染色,Image J软件测定脑梗死范围百分比。

2.4 苏木素-伊红(HE)染色检测 各组大鼠脑、结肠组织病理改变 大鼠处死后留取脑组织、结肠组

织,用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)溶液冲洗,4%多聚甲醛固定,常规脱水、石蜡包埋、切片,进行HE染色,中性树胶封片后在倒置显微镜下观察脑组织、结肠组织形态变化并拍摄病理图片。

2.5 ELISA检测血清和缺血区脑组织IL-10,IL-17水平 使用ELISA试剂盒检测血清和缺血区脑组织IL-10,IL-17,实验步骤严格按照说明书进行。

2.6 免疫组化法检测大鼠脑组织、结肠组FoxP3,IL-17蛋白的表达 免疫组化检测大鼠脑组织、结肠组织FoxP3,IL-17蛋白表达。使用组织切片将石蜡包埋脑、结肠组织切成4~5 μm的薄片,放置于黏附载玻片上,二甲苯脱蜡,乙醇水化,双氧水淬灭过氧化物酶,EDTA修复抗原,山羊血清封闭,一抗(FoxP3,IL-17 1:100)孵育过夜,二抗(1:500)孵育30 min,链霉卵白素孵育30 min,DAB显色,苏木素复染,中性树脂封片,电子显微镜观察并拍照。每张切片随机选取5个视野(×400),使用Image Pro Plus 6.0软件计算每个视野下阳性结果的积分吸光度IA和面积,以IA/面积作为检测指标的半定量结果。

2.7 流式细胞术检测外周血Th17细胞,CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺细胞的表达 外周血加红细胞裂解液3 mL,混匀静置4~5 min,待红细胞完全破碎;加PBS 5 mL重悬细胞,缓慢加至含有淋巴细胞分离液3 mL的15 mL离心管液面上(室温),1 200 r·min⁻¹室温离心20 min(离心半径28 cm),吸出雾状单个核细胞层;洗涤2遍,加入FACS buffer 5 mL重悬细胞,1 200 r·min⁻¹离心5 min(离心半径28 cm),去上清;用余液重悬细胞;固定液室温孵育10 min;加入破膜剂混匀后37℃孵育10 min通透细胞;按抗体说明书加入适量抗体混匀后,37℃避光孵育30 min;加入PBS 400 μL后避光保存等待上机。

2.8 Real-time PCR检测大鼠结肠组织Occludin,ZO-1 mRNA表达 称取结肠组织20 mg,加入TRIzol 500 μL,45 W超声破碎50 s(工作20 s,间歇10 s)后,加入三氯甲烷100 μL,振荡混匀后室温静置10 min,4℃,11 300 r·min⁻¹离心15 min(离心半径7 cm),取上层水相加入异丙醇250 μL,混匀后室温静置10 min,4℃,11 300 r·min⁻¹离心10 min(离心半径7 cm),弃上清,再分别经75%乙醇和无水乙醇清洗后离心10 min得到结肠总RNA并测定浓度。使用PrimeScript™ RT Master Mix试剂盒进行反转录,得到cDNA,以该cDNA为模板,使用

SYBR Premix Ex Taq™ II进行Real-time PCR反应,预变性95℃,10 min,44个循环反应,95℃15 s,60℃60 s。文中用于Real-time PCR的引物序列来源于检索NCBI基因数据库,通过基因ID在Primer Bank中获得相关引物序列。以β-肌动蛋白(β-actin)为内参,2^{-ΔΔC_t}法计算mRNA相对表达量,引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'→3')	长度/bp
ZO-1	上游 AGGTGAAACTCTGCTGAGCC	90
	下游 TCACAGTGTGGCAAGCGTAG	
Occludin	上游 GGTGAGCGGTTCTTCTGTGT	93
	下游 GGCCACACTGTAGTTGGTGT	
β-actin	上游 GCAGGAGTACGATGAGTCCG	74
	下游 ACGCAGCTCAGTAACAGTCC	

2.9 粪便样本收集与检测 术后72 h收集各组大鼠粪便样本,取新鲜大鼠粪便2~3粒放入无菌冻存管中,在液氮中进行速冻,再将样本转移至-80℃冰箱中储存,后续用于送检菌群测定。粪便细菌总DNA提取及质量检测,16S rRNA基因V3~V4区PCR扩增,16S rRNA Miseq高通量测序,生物学分析由杭州联川生物公司完成。

2.10 统计学分析 实验数据采用Excel存储,Prism 7软件分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用T检验,多组间数据比较用单因素方差分析,组间比较用图基(Tukey)检验,以P<0.05为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠神经功能评分及脑梗死面积的影响

大鼠脑缺血再灌注72 h后,与假手术组比较,模型组大鼠神经功能缺损评分明显升高,脑梗死面积明显增加(P<0.05);与模型组比较,化浊解毒活血通络方高、中剂量组大鼠神经功能缺损评分降低,脑梗死面积减小(P<0.05);与化浊解毒活血通络方高剂量组比较,化浊解毒活血通络方低剂量组大鼠神经功能缺损评分升高,脑梗死面积增加(P<0.05)。见表2,3,图1。

3.2 对大鼠脑组织病理的影响

假手术组大鼠脑组织未见异常改变,细胞排列整齐,形态规则,胞浆染色均匀,细胞膜完整,细胞核、核仁清晰,无变性坏死细胞。与假手术组比较,模型组脑组织缺血区

表2 化浊解毒活血通络方对各组大鼠神经功能评分的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 2 Effect of Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo prescription on neurological function score in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

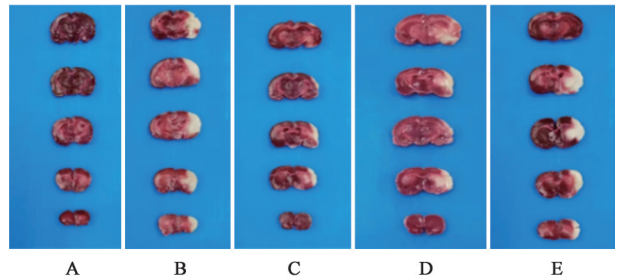
组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	神经功能评分/分
假手术		0
模型		10.10 \pm 1.37 ¹⁾
化浊解毒活血通络方	25.0	7.20 \pm 1.32 ²⁾
	12.5	7.50 \pm 1.18 ²⁾
	6.25	9.60 \pm 0.97 ³⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$;与化浊解毒活血通络方高剂量组比较³⁾ $P<0.05$ (表3~11同)。

表3 化浊解毒活血通络方对各组大鼠脑梗死面积的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 3 Effect of Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo prescription on cerebral infarction area in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	脑梗死面积/%
假手术		0
模型		15.45 \pm 0.50 ¹⁾
化浊解毒活血通络方	25.0	10.41 \pm 0.39 ²⁾
	12.5	11.11 \pm 0.36 ²⁾
	6.25	14.77 \pm 0.56 ³⁾



A. 假手术组; B. 模型组; C~E. 化浊解毒活血通络方高、中、低剂量组(图2~6同)

图1 化浊解毒活血通络方对各组大鼠脑梗死面积的影响

Fig. 1 Effect of Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo prescription on cerebral infarction area of rats in each group

域可见大量细胞变性、坏死,细胞排列紊乱,细胞间隙增大,胞浆染色变浅,细胞核固缩、深染,有炎症细胞浸润。与模型组比较,中药各组脑组织病理状态有所改善,以化浊解毒活血通络方高、中剂量组改善明显。见图2。

3.3 对大鼠结肠组织病理的影响 假手术组结肠黏膜未见明显损伤。与假手术组比较,模型组结肠可看到黏膜少许破坏,黏膜水肿,绒毛形态不规则,局部出现黏膜破损,经化浊解毒活血通络方治疗后上述情况好转。见图3。

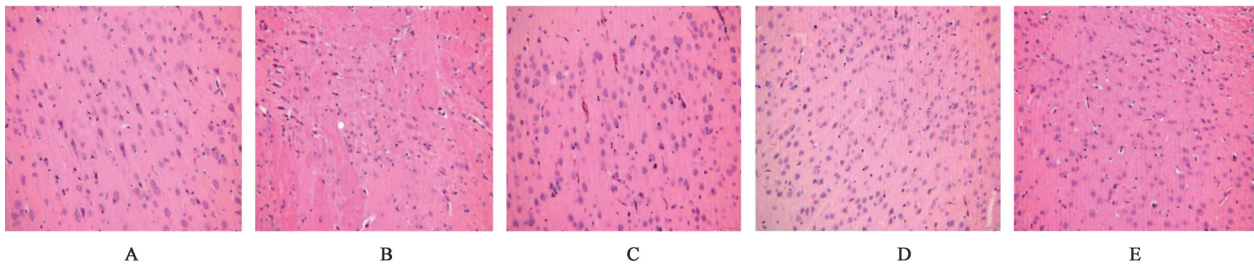


图2 化浊解毒活血通络方对各组大鼠脑组织病理的影响(HE, $\times 400$)

Fig. 2 Effect of Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo prescription on brain histopathology of rats in each group (HE, $\times 400$)

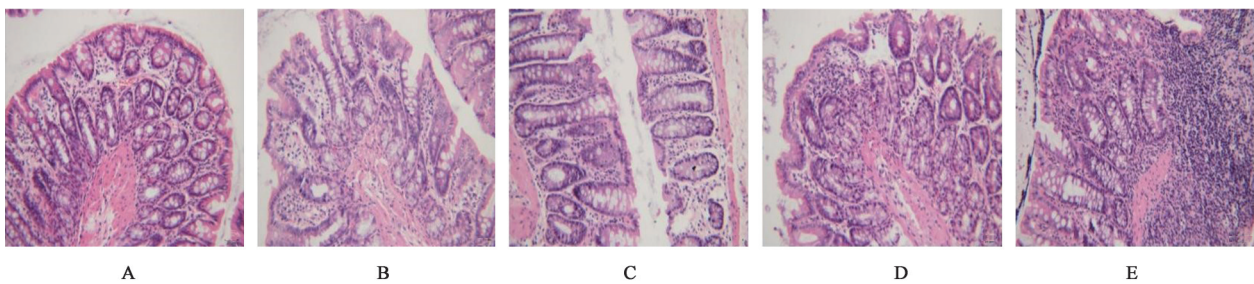


图3 化浊解毒活血通络方对各组大鼠结肠组织病理的影响(HE, $\times 400$)

Fig. 3 Effect of Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo prescription on colon histopathology of rats in each group (HE, $\times 400$)

3.4 对大鼠肠组织 Occludin, ZO-1 mRNA 表达的影响 与假手术组比较,模型组 Occludin, ZO-1 mRNA 表达水平明显下降($P<0.05$);与模型组比较,化浊解毒活血通络方高剂量组 Occludin, ZO-1 mRNA 表达水平有所增加($P<0.05$);与化浊解毒

活血通络方高剂量组比较,化浊解毒活血通络方低剂量组 Occludin mRNA 表达水平下降($P<0.05$)。见表4。

3.5 对大鼠肠道菌群的影响

3.5.1 各组大鼠肠道菌群多样性分析 Shannon 指

表4 化浊解毒活血通络方对各组大鼠 Occludin, ZO-1 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 4 Effect of Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo prescription on expression levels of Occludin and ZO-1 mRNA in each group ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Occludin	ZO-1
假手术		1.19±0.21	1.23±0.23
模型		0.79±0.21 ¹⁾	0.87±0.10 ¹⁾
化浊解毒活血通络方	25.0	1.10±0.23 ²⁾	1.15±0.10 ²⁾
	12.5	1.00±0.16 ²⁾	0.98±0.21
	6.25	0.90±0.15 ³⁾	0.94±0.16

数和 Simpson 指数反映物种的丰富度和均匀度,与假手术组比较,模型组大鼠肠道菌群 Shannon 和 Simpson 指数降低;与模型组比较,中药各组大鼠肠道菌群 Shannon 和 Simpson 指数升高,以高剂量组最显著。见图4。

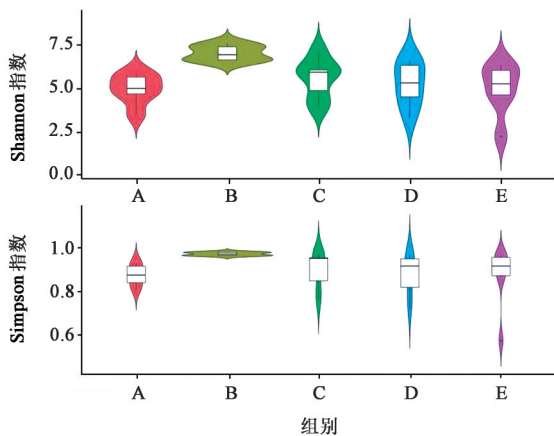


图4 化浊解毒活血通络方对各组大鼠 Shannon 指数, Simpson 指数的影响

Fig. 4 Effect of Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo prescription on Shannon index and Simpson index in each group

3.5.2 对 各 组 大 鼠 肠 道 菌 群 的 影 响 使 用 非 参 数 因 子 克 鲁 斯 卡 尔 - 沃 利 斯 秩 和 检 验 检 测 具 有 显 著 丰 度 差 异 特 征, 并 找 到 与 丰 度 有 差 异 的 类 群。 在 门 水 平, 与 假 手 术 组 比 较, 模 型 组 厚 壁 菌 门、 拟 杆 菌 门 下

表7 化浊解毒活血通络方对各组大鼠肠道微生物属水平相对丰度的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 7 Effect of Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo prescription on relative abundance of intestinal microbial genera of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	梭菌属	普雷沃菌属	肠球菌属
假手术		0.05±0.01	0.84±0.30	0.00±0.00
模型		0.17±0.05 ¹⁾	0.02±0.01 ¹⁾	0.20±0.59 ¹⁾
化浊解毒活血通络方	25.0	0.02±0.01 ²⁾	0.24±0.60 ²⁾	0.03±0.01 ²⁾
	12.5	0.05±0.35	0.09±0.05	0.11±0.03
	6.25	0.08±0.49	0.34±0.19	0.09±0.04

降 ($P<0.05$); 与 模 型 组 比 较, 化 浊 解 毒 活 血 通 络 方 高 剂 量 组 厚 壁 菌 门、 拟 杆 菌 门 升 高 ($P<0.05$)。 见 表 5。

表5 化浊解毒活血通络方对各组大鼠肠道微生物门水平相对丰度的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo prescription on relative abundance of intestinal microphylum levels in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	厚壁菌门	拟杆菌门
假手术		50.04±6.35	39.23±6.75
模型		18.64±4.01 ¹⁾	31.98±4.60 ¹⁾
化浊解毒活血通络方	25.0	32.84±9.66 ²⁾	38.52±5.97 ²⁾
	12.5	20.84±4.75	36.34±7.17
	6.25	27.11±4.00	33.02±9.78

在 科 水 平, 与 假 手 术 组 比 较, 模 型 组 肠 杆 菌 科 升 高 ($P<0.05$), 乳 杆 菌 科 下 降 ($P<0.05$); 与 模 型 组 比 较, 化 浊 解 毒 活 血 通 络 方 高 剂 量 组 肠 杆 菌 科 下 降 ($P<0.05$), 乳 杆 菌 科 升 高 ($P<0.05$)。 见 表 6。

表6 化浊解毒活血通络方对各组大鼠肠道微生物科水平相对丰度的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 Effect of Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo prescription on relative abundance of intestinal microbiota levels in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	肠杆菌科	乳杆菌科
假手术		0.17±0.24	7.38±2.78
模型		20.06±5.87 ¹⁾	0.70±0.27 ¹⁾
化浊解毒活血通络方	25.0	4.96±2.14 ²⁾	7.50±2.41 ²⁾
	12.5	18.28±6.17	4.71±1.91
	6.25	18.05±8.46	5.18±1.82

在 属 水 平, 与 假 手 术 组 比 较, 模 型 组 普 雷 沃 氏 菌 属 下 降 ($P<0.05$), 梭 菌 属、 肠 球 菌 属 升 高 ($P<0.05$); 与 模 型 组 比 较, 化 浊 解 毒 活 血 通 络 方 高 剂 量 组 普 雷 沃 氏 菌 属 升 高 ($P<0.05$), 梭 菌 属、 肠 球 菌 属 下 降 ($P<0.05$)。 见 表 7。

3.6 对大鼠辅助性T细胞17(Th17),IL-17表达的影响 结肠、缺血区脑组织免疫组化结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠IL-17表达明显增高($P<0.05$),与模型组比较,化浊解毒活血通络方高剂量组可以明显降低IL-17表达($P<0.05$)。见表8,图5。

与假手术组比较,模型组Th17细胞的比例明显增高($P<0.05$);与模型组比较,化浊解毒活血通络方高、中剂量组可以明显降低Th17细胞的分布比例,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与假手术组比较,模型组中的IL-17的水平明显升高($P<0.05$);与模型组比较,化浊解毒活血通络方高、中剂量组IL-17

表8 化浊解毒活血通络方对各组大鼠IL-17表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 8 Effect of Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo prescription on expression of IL-17 protein in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-17/IA	
		结肠	脑组织
假手术		0.50±0.02	0.04±0.01
模型		0.13±0.02 ¹⁾	0.13±0.02 ¹⁾
化浊解毒活血通络方	25.0	0.06±0.03 ²⁾	0.05±0.01 ²⁾
	12.5	0.07±0.01 ²⁾	0.05±0.02 ²⁾
	6.25	0.08±0.02	0.11±0.03 ³⁾

的表达明显降低($P<0.05$)。见表9。

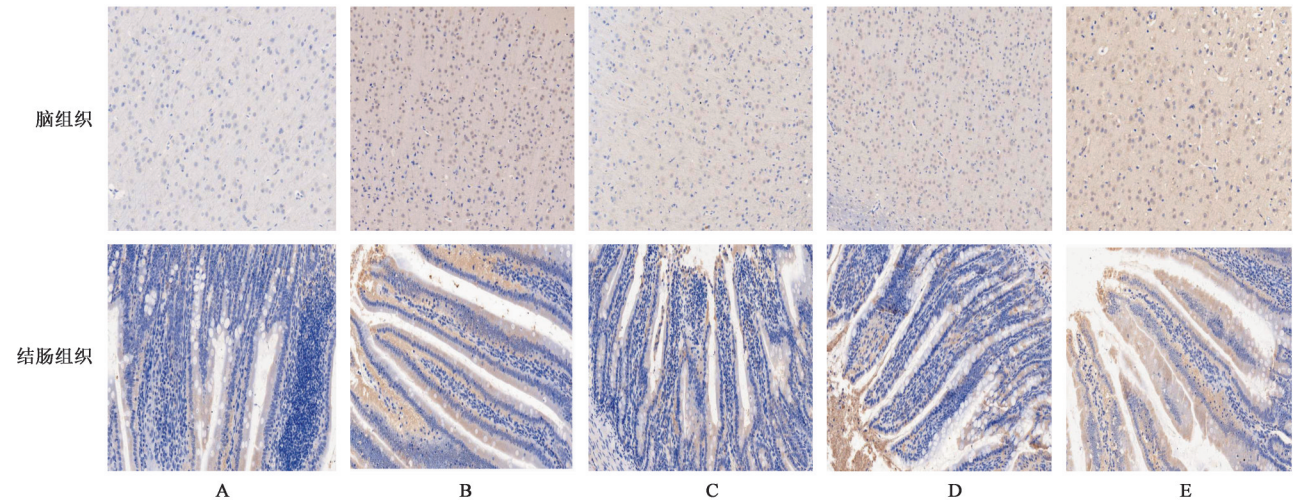


图5 化浊解毒活血通络方对各组大鼠IL-17表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 5 Effect of Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo prescription on expression of IL-17 in each group (IHC, ×400)

表9 化浊解毒活血通络方对各组大鼠Th17及IL-17表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 9 Effect of Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo prescription on Th17 and IL-17 expression in each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Th17/%	IL-17	
			血清/ng·L ⁻¹	脑组织/ng·g ⁻¹
假手术		39.32±3.96	48.92±7.70	3.00±0.14
模型		66.96±5.92 ¹⁾	71.94±5.65 ¹⁾	4.00±0.29 ¹⁾
化浊解毒活血通络方	25.0	42.68±3.85 ²⁾	51.47±3.44 ²⁾	3.12±0.14 ²⁾
	12.5	35.37±6.66 ²⁾	53.33±3.03 ²⁾	3.28±0.16 ²⁾
	6.25	60.17±14.67 ³⁾	64.26±10.45 ³⁾	3.64±0.23 ³⁾

3.7 对大鼠FoxP3⁺,IL-10的影响 结肠、缺血区脑组织免疫组化结果显示,与假手术组比较,模型组FoxP3⁺表达下降($P<0.05$);与模型组比较,化浊解毒活血通络方高、中剂量组FoxP3⁺表达明显增加($P<0.05$)。见图6,表10。流式细胞仪检测外周血中CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺的比例,结果显示与组织中的结果表达一致,差异有统计学意义($P<0.05$)。与假

手术组比较,模型组IL-10表达明显下降($P<0.05$);与模型组比较,化浊解毒活血通络方高、中剂量组IL-10表达明显增加($P<0.05$)。见表11。

4 讨论

人的肠道内含有数万种不同的菌群,正常情况下肠道菌群处于一个平衡的状态,菌群多样性的丧失和改变致使肠道功能失调,肠壁通透性增加,炎

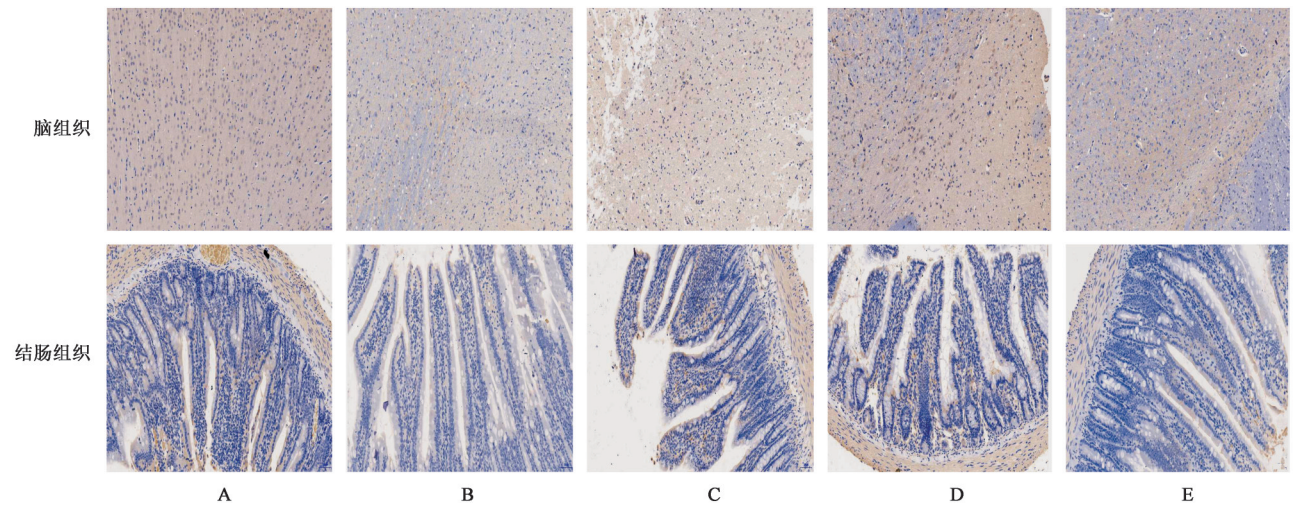


图6 化浊解毒活血通络方对各组大鼠FoxP3⁺表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 6 Effect of Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo prescription on FoxP3⁺ expression in each group (IHC, ×400)

表10 化浊解毒活血通络方对各组大鼠FoxP3⁺蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 10 Effect of Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo prescription on FoxP3⁺ expression in each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IA	
		结肠	脑组织
假手术		0.13±0.02	0.10±0.04
模型		0.06±0.02 ¹⁾	0.04±0.02 ¹⁾
化浊解毒活血通络方	25.0	0.11±0.02 ²⁾	0.13±0.02 ²⁾
	12.5	0.10±0.01 ²⁾	0.11±0.03 ²⁾
	6.25	0.07±0.01 ³⁾	0.06±0.01 ³⁾

症加重,这些炎症细胞透过肠壁,随外周血液循环进入大脑,进一步加重CIRI^[16-17]。急性脑缺血引起局部神经炎症反应,同时改变周围免疫稳态。最近的证据表明,肠道微生物群通过调节免疫稳态在自身免疫性疾病中起关键作用。因此,课题组研究了急性脑缺血、微生物群改变和脑损伤后免疫反应之间的机制联系。

脑神失常,则易肠腑失控,传导失司,肠腑以通为用,腑气不通,冲逆犯上,又可影响神明。在临床

上脑部疾病常从腑论治。中风多因肝木亏损,肾阴不足,水不涵木,肝木火旺,上亢引动风阳,脑窍蒙闭或气虚血瘀,经脉不通。胃肠不通则中州传输不利,升降失常,糟粕内结,气机阻滞,形成腑实之证。脑病治疗泻腑实以养神,腑畅神安,从现代医学的脑-肠轴和肠道菌群学说上可以解释。中风后湿热痰瘀等浊毒闭阻肠道,腑气不通反而上逆,导致浊毒闭阻脑络,气血瘀滞,脉络不通。化浊解毒活血通络法在此理论上提出。化浊解毒活血通络方中黄连清热燥湿,泻火解毒,茯苓、泽泻健脾利水渗湿;赤芍、丹参、当归、川芎活血行气化瘀,另外川芎味辛上行头目,有引药上行之效;石菖蒲、郁金降气化痰祛湿,地龙清热熄风;甘草调和诸药,诸药合用共奏化浊解毒活血通络之效。

卒中损伤后肠道菌群多样性及物种组成会发生一系列变化^[4]。研究发现,在脑卒中患者中变形菌门、乳酸杆菌科、肠杆菌科和卟啉单胞菌科的丰度增加, *Odoribacter* 属, *Akkermansia* 属和 *Ruminococcaceae_UCG_005* 属的相对丰度明显更高,而厚壁菌门和拟杆菌门、双歧杆菌的水平降

表11 化浊解毒活血通络方对各组大鼠CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺及IL-10表达情况($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 11 Effect of Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo prescription on CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cells and IL-10 expression in each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ 细胞/%	IL-10	
			血清/ng·L ⁻¹	脑组织/ng·g ⁻¹
假手术		12.18±1.41	101.32±9.90	1.09±0.03
模型		5.63±1.11 ¹⁾	57.98±8.07 ¹⁾	0.84±0.07 ¹⁾
化浊解毒活血通络方	25.0	10.48±1.24 ²⁾	78.19±1.32 ²⁾	1.04±0.09 ²⁾
	12.5	9.48±0.92 ²⁾	98.28±7.44 ²⁾	1.01±0.05 ²⁾
	6.25	5.18±0.19 ³⁾	57.98±10.68 ³⁾	0.84±0.08 ³⁾

低^[18-19]。本研究发现,假手术组与模型组的肠道菌群发生了明显的变化,由 Shannon 指数, Simpson 指数,主坐标分析(PCoA)可知 CIRI 大鼠的肠道菌群的物种多样性及丰度显著下降,经中药干预后物种的多样性较模型组增高。其中化浊解毒活血通络方高剂量治疗后菌群改变更为明显,具体表现为有益菌群如厚壁菌门、拟杆菌门等丰度升高,机会致病菌群如肠杆菌科, *Akkermansia* 属丰度下降,因此改变了肠道菌群的生态环境。

正常的肠道功能除了维持肠道菌群的稳态,肠道黏膜屏障功能也至关重要。肠杆菌科是临床上常见的条件致病菌,能够介导肠道内炎症,并通过破坏的肠上皮细胞屏障移位至体循环,感染各器官诱发各种炎症反应^[20]。肠杆菌科过度生长通常是肠道微生物失调和肠道通透性增加的一种特征^[21]。乳杆菌科细菌可以代谢产生大量的短链脂肪酸参与调节肠道免疫和屏障功能,对肠道屏障具有保护作用。本实验研究发现, CIRI 后肠道菌群 MCAO 组大鼠肠道菌群中肠杆菌科表达上调,乳杆菌科表达下降,结肠组织 ZO-1, Occludin 表达下降,经化浊解毒活血通络方治疗后肠杆菌科表达下调,乳杆菌科表达上调, ZO-1, Occludin 表达上调,与上述研究一致,表明化浊解毒活血通络通过调节肠道菌群对 CIRI 大鼠的肠道屏障功能产生保护作用。

Th17 和 Treg 的平衡是胃肠道内外环境的一个关键屏障^[22]。肠道菌群失调导致 T 细胞亚群数量和活性失衡,进而引发多种代谢或免疫紊乱相关疾病。肠道菌群中的大肠埃希菌属、拟杆菌属、乳杆菌属和链球菌属可以在小肠和结肠固有层中促进 Treg 诱导、迁移和增殖^[23-25]。研究表明,在广谱抗生素治疗或无菌培养条件下,结肠 Treg 数量的减少这进一步证明肠道菌群对于 Treg 分化的重要性^[26]。肠道 Th17 是在肠道共生菌和某些细胞外病原体的定植下诱导和积累的^[27],具有强大的促炎性。结肠中 Th17 是由肠道菌群的代谢物 ATP 诱导的^[28]。

肠道生态失调导致外周血中 Treg 减少,辅助性 T 细胞(Th1 和 Th17)增加^[29-30],活化的 T 淋巴细胞从外周迁移到中枢神经系统,分泌细胞黏附分子和趋化因子,导致单核细胞和巨噬细胞浸润中枢神经系统^[31]。Th17 在维持肠黏膜屏障,炎症和微生物易位中起着重要作用,并具有有效突破血脑屏障渗入中枢神经系统的功能。BENAKIS 等^[6]通过荧光标记 MCAO 大鼠肠道内的 T 细胞发现肠道分泌的 Treg, Th17 可迁移到损伤的脑组织, Th17 细胞增加加重

了小鼠卒中后炎症。本课题组前期研究发现, MCAO 大鼠血脑屏障通透性增加,经化浊解毒活血通络方治疗对血脑屏障起保护作用。本实验研究发现 MCAO 组大鼠肠道组织、外周血和缺血区脑组织中 Treg 分泌减少, Th17 分泌增加。经化浊解毒活血通络方干预后,大鼠肠道组织、外周血和缺血区脑组织中 Treg 分泌明显增加, Th17 分泌减少,表明化浊解毒活血通络方可能是通过降低肠道组织 Treg, Th17 的表达,减少 Treg, Th17 的迁移至脑组织从而减轻 CIRI。

综上所述,化浊解毒活血通络方通过调节卒中后肠道菌群的紊乱和肠道屏障的破坏,抑制炎症反应,恢复 CIRI 大鼠的肠-脑轴平衡,从而影响脑卒中的预后。本研究结果将为脑卒中的临床治疗和脑卒中后肠功能障碍的预防提供新的思路。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] JOHNSON W, ONUMA O, OWOLABI M, et al. Stroke: a global response is needed [J]. Bull World Health Organ, 2016, 94(9):634-634A.
- [2] KATSANOS A H. Updates in stroke treatment, diagnostic methods and predictors of outcome [J]. J Clin Med, 2020, 9(9):2789.
- [3] DU D L, WEI T, CHAO Z, et al. Fecal microbiota transplantation is a promising method to restore gut microbiota dysbiosis and relieve neurological deficits after traumatic brain injury [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, doi:10.1155/2021/5816837.
- [4] SINGH V, ROTH S, LLOVERA G, et al. Microbiota dysbiosis controls the neuroinflammatory response after stroke [J]. J Neurosci, 2016, 36(28):7428-7440.
- [5] WELLS J M, BRUMMER R J, DERRIEN M, et al. Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2017, 312(3):G171-G193.
- [6] BENAKIS C, BREA D, CABALLERO S, et al. Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating intestinal $\gamma\delta$ T cells [J]. Nat Med, 2016, 22(5):516-523.
- [7] HOOPER L V, WONG M H, THELIN A, et al. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine [J]. Science, 2001, 291(5505):881-884.
- [8] RAKOFF-NAHOUM S, PAGLINO J, ESLAMI-VARZANEH F, et al. Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for

- intestinal homeostasis [J]. Cell, 2004, 118 (2) : 229-241.
- [9] SHICHITA T, SUGIYAMA Y, OOBOSHI H, et al. Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadelta T cells in the delayed phase of ischemic brain injury[J]. Nat Med, 2009, 15(8):946-950.
- [10] LIESZ A, ZHOU W, NA S Y, et al. Boosting regulatory T cells limits neuroinflammation in permanent cortical stroke [J]. J Neurosci, 2013, 33 (44):17350-17362.
- [11] WANG Y, YIN Y, CHEN X, et al. Induction of intestinal Th17 cells by flagellins from segmented filamentous bacteria [J]. Front Immunol, 2019, 10: 2750.
- [12] ARPAIA N, CAMPBELL C, FAN X, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation [J]. Nature, 2013, 504 (7480):451-455.
- [13] DA SILVA S , ROBBE-MASSELOT C, AIT-BELGNAOUI A, et al. Stress disrupts intestinal mucus barrier in rats via mucin O-glycosylation shift: prevention by a probiotic treatment[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2014, 307(4):420-429.
- [14] 李希, 万溪, 高晶晶, 等. 化浊解毒活血通络方对脑缺血再灌注损伤大鼠 ZO-1 和 Occludin 表达的影响[J]. 环球中医药, 2017, 10(7):796-801.
- [15] 赵见文, 田军彪, 张颜伟, 等. 化浊解毒活血通络方对脑缺血再灌注损伤小鼠血清 IL-6 和 TNF- α 水平的影响[J]. 世界中医药, 2012, 7(1):70-71.
- [16] TILG H. A gut feeling about thrombosis[J]. N Engl J Med, 2016, 374(25):2494-2496.
- [17] WINEK K, MEISEL A, DIRNAGL U. Gut microbiota impact on stroke outcome: fad or fact? [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2016, 36(5):891-899.
- [18] XIANG L, LOU Y, LIU L, et al. Gut microbiotic features aiding the diagnosis of acute ischemic stroke [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 3389 (10) : 587284.
- [19] TAN C, WU Q, WANG H, et al. Dysbiosis of gut microbiota and short-chain fatty acids in acute ischemic stroke and the subsequent risk for poor functional outcomes[J]. J Parenter Enteral Nutr, 2020, 45(3):518-529.
- [20] YUAN W, ZHANG Y, RIAZ L, et al. Multiple antibiotic resistance and DNA methylation in Enterobacteriaceae isolates from different environments [J]. J Hazard Mater, 2021, 402(10):123822.
- [21] LAVAL L, MARTIN R, NATIVIDAD J N, et al. Lactobacillus rhamnosus CNCM I-3690 and the commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165 exhibit similar protective effects to induced barrier hyper-permeability in mice[J]. Gut Microbes, 2015, 6 (1):1-9.
- [22] LUO A, LEACH S T, BARRES R, et al. The microbiota and epigenetic regulation of T helper 17/ regulatory T cells: in search of a balanced immune system[J]. Front Immunol, 2017, 8:417
- [23] GEVA-ZATORSKY N, SEFIK E, KUA L, et al. Mining the human gut microbiota for immunomodulatory organisms[J]. Cell, 2017, 168(5): 928-943.
- [24] THURSBY E, JUGE N. Introduction to the human gut microbiota[J]. Biochem J, 2017, 474(11):1823-1836.
- [25] BROWN E M, KENNY D J, XAVIER R J. Gut microbiota regulation of T cells during inflammation and autoimmunity [J]. Annu Rev Immunol, 2019, 37: 599-624.
- [26] FURUSAWA Y, OBATA Y, FUKUDA S, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells[J]. Nature, 2013, 504(7480):446-450.
- [27] ATARASHI K, TANOUE T, ANDO M, et al. Th17 cell induction by adhesion of microbes to intestinal epithelial cells[J]. Cell, 2015, 163(2):367-380.
- [28] FURUSAWA Y, OBATA Y, HASE K. Commensal microbiota regulates T cell fate decision in the gut[J]. Semin Immunopathol, 2015, 37(1):17-25.
- [29] DUSCHA A, GISEVIUS B, HIRSCHBERG S, et al. Propionic acid shapes the multiple sclerosis disease course by an immunomodulatory mechanism[J]. Cell, 2020, 180(6):1067-1080.
- [30] ATARASHI K, TANOUE T, OSHIMA K, et al. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota [J]. Nature, 2013, 500(7461):232-236.
- [31] LEGROUX L, ARBOUR N. Multiple sclerosis and T lymphocytes: an entangled story [J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2015, 10(4):528-546.

[责任编辑 王鑫]