

半夏泻心汤及其拆方对菌群紊乱幼鼠结肠黏膜免疫的影响

戴丽蓉¹, 陈启明^{2*}, 刘喜平¹, 林延延², 李侃², 岳娟¹, 葛艳²,
李沛清¹, 朱中博¹, 张金铎², 施丽娟¹

(1. 甘肃中医药大学 甘肃省中药新产品创制工程实验室, 甘肃省中医方药挖掘与创新转化重点实验室, 兰州 730000; 2. 兰州大学第一医院, 兰州 730013)

[摘要] 目的:探讨半夏泻心汤及其拆方对混合抗生素诱导的菌群紊乱幼鼠的治疗作用及可能的作用机制。方法:将70只雄性BALB/c小鼠随机分为7组,分别为空白组、模型组、双歧杆菌四联活菌片组(西药组,0.68 g·kg⁻¹)及半夏泻心汤全方组、辛开组、苦降组、甘补组(9.1、3.19、1.82、4.1 g·kg⁻¹),每组10只。除空白组外,其余各组予混合抗生素灌胃诱导肠道菌群紊乱,14 d后西药组予双歧杆菌四联活菌片灌胃,全方组、辛开组、苦降组及甘补组分别予半夏泻心汤及不同配伍药组灌胃,空白组、模型组给予等体积生理盐水,1次/d,共14 d。连续给药14 d后无菌采集粪便样本用于16SrDNA测序分析肠道菌群,并经腹腔注射脂多糖(LPS,10 mg·kg⁻¹)诱导炎症反应,苏木素-伊红(HE)染色观察结肠黏膜组织形态,甲苯胺蓝染色和免疫组织化学观察结肠黏膜巨噬细胞浸润,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-8(IL-8)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及白细胞介素-10(IL-10) mRNA的表达情况。结果:与空白组比较,模型组幼鼠肠道微生物结构显著改变($P<0.01$),结肠黏膜损伤明显,巨噬细胞浸润减少,炎症因子IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 及IL-10 mRNA表达水平均显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,西药组、半夏泻心汤及其拆方组均能增加菌群相对丰度和物种多样性,提高拟杆菌门、厚壁菌门等有益菌的比例($P<0.01$);同时西药组、半夏泻心汤及其拆方组均能改善结肠黏膜损伤($P<0.05$, $P<0.01$),增加巨噬细胞浸润($P<0.05$, $P<0.01$),升高IL-6、IL-8、TNF- α mRNA表达水平($P<0.01$);西药组、半夏泻心汤及苦降、甘补组升高IL-1 β mRNA表达($P<0.01$);西药组、半夏泻心汤及辛开、甘补组IL-10 mRNA表达升高($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:半夏泻心汤及拆方组能调整抗生素暴露幼鼠肠道菌群,保护肠道菌群紊乱后结肠黏膜免疫屏障,以半夏泻心汤全方为最佳配伍。

[关键词] 半夏泻心汤; 肠道菌群; 抗生素; 肠道免疫; 配伍研究

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R574.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)11-0042-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221038

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220328.0946.001.html>

[网络出版日期] 2022-03-28 17:09

Banxia Xiexintang and Its Disassembled Prescriptions Regulate Colonic Mucosal Immunity in Young Rats with Flora Disorder

DAI Li-rong¹, CHEN Qi-ming^{2*}, LIU Xi-ping¹, LIN Yan-yan², LI Kan², YUE Juan¹, GE Yan²,
LI Pei-qing¹, ZHU Zhong-bo¹, ZHANG Jin-duo², SHI Li-juan¹

(1. Gansu Engineering Laboratory for New Products of Traditional Chinese Medicine (TCM), Gansu Key Laboratory of TCM Excavation and Innovative Transformation, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730013, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the therapeutic effect and possible mechanism of Banxia Xiexintang

[收稿日期] 2021-11-02

[基金项目] 国家自然科学基金项目(32160255);甘肃省青年科技基金计划项目(21JR7RA388,20JR10RA703,20JR5RA350);甘肃省高等学校创新基金项目(2020B-007);甘肃省委组织部陇原青年创新创业人才项目(2020RCXM183);甘肃省中医方药挖掘与创新转化重点实验室开放基金项目(ZYFY-2020-003)

[第一作者] 戴丽蓉,硕士,讲师,从事中西医结合基础研究,E-mail:549635490@qq.com

[通信作者] *陈启明,硕士,主治医师,从事中西医结合重症医学研究,E-mail:81355875@163.com

and its disassembled prescriptions in regulating the flora disorder induced by mixed antibiotics in young rats. **Method:** Seventy male BALB/C young rats were randomly assigned into 7 groups: blank group, model group, Bifidobacterium tetralogy viable tablets ($0.68 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, Banxia Xiexintang ($9.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, Xinkai ($3.19 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, Kujiang ($1.82 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, and Ganbu ($4.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, with 10 rats in each group. Except the blank group, the other groups were given mixed antibiotics by gavage to induce intestinal flora disorder. After 14 days, the rats in different drug groups were administrated with corresponding drugs by gavage, and those in the blank group and model group with the same amount of normal saline once a day for 14 days. After that, fecal samples were collected aseptically for 16S rDNA sequencing of intestinal flora, and lipopolysaccharide (LPS, $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) was injected intraperitoneally to induce inflammatory reaction. The tissue morphology of colonic mucosa was observed via hematoxylin-eosin (HE) staining, and the macrophage infiltration of colonic mucosa was observed via toluidine blue staining and immunohistochemistry. The expression of interleukin- 1β (IL- 1β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukin-10 (IL-10) mRNA were determined by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** Compared with the blank group, the modeling changed the intestinal flora structure of the young rats ($P<0.01$), damaged the colonic mucosa, reduced the macrophage infiltration, and down-regulated the mRNA levels of IL- 1β , IL-6, IL-8, TNF- α , and IL-10 ($P<0.01$). Compared with the model group, bifidobacterium quadruple viable tablets, Banxia Xiexintang and its disassembled prescriptions increased the diversity of intestinal flora and the relative abundance of beneficial bacteria such as Bacteroidetes and Firmicutes ($P<0.01$). At the same time, they ameliorated colonic mucosal injury ($P<0.05$, $P<0.01$), increased macrophage infiltration ($P<0.05$, $P<0.01$), and up-regulated the mRNA levels of IL-6, IL-8, and TNF- α ($P<0.01$). The mRNA level of IL- 1β was up-regulated in Bifidobacterium tetralogy viable tablets, Banxia Xiexintang, Kujiang, and Ganbu groups ($P<0.01$), and that of IL-10 was up-regulated in Bifidobacterium tetralogy viable tablets, Banxia Xiexintang, Xinkai, and Ganbu groups ($P<0.01$). **Conclusion:** Banxia Xiexintang and the disassembled prescriptions can adjust the intestinal flora of young rats exposed to antibiotics and protect the immune barrier of colonic mucosa after intestinal flora disorder. In particularly, the whole prescription of Banxia Xiexintang demonstrates the best performance.

[Keywords] Banxia Xiexintang; intestinal flora; antibiotics; intestinal immunity; study of compatibility

生命早期阶段肠道菌群的定植与建立对消化系统、免疫系统和代谢等发育和成熟具有重大作用,而此阶段更易受到外界抗生素等诸多因素干扰,导致菌群紊乱、影响免疫反应、改变肠屏障结构,从而成为一系列感染性疾病、炎症性疾病及功能性胃肠病等肠道菌群紊乱相关疾病发生的基础^[1-2]。因此,生命早期阶段肠道菌群的研究,对认识肠道菌群功能、防治肠道菌群紊乱相关疾病具有重要意义。通过中医药干预防治肠道菌群紊乱并治疗,已成为近年来关注的热点,现有研究多见于中医证候与菌群的相关性、方剂功效及组成药物功效等^[3-4]。其中,经方半夏泻心汤具有寒热并用、辛开苦降、补泻兼施的配伍特点,广泛应用于胃炎、肠炎、胃溃疡及胃肠功能紊乱等消化系统疾病。已有研究表明半夏泻心汤可通过调整肠道菌群防治炎症性肠病^[5-7],并通过干预菌群影响糖尿病发病过程

及相关并发症。具有提高机体免疫机能、减轻炎症反应,保护胃肠黏膜的作用^[8]。课题组前期研究发现,半夏泻心汤对肠道菌群紊乱后幼鼠肠黏膜屏障具有保护作用^[9],但是否能通过保护结肠屏障进一步改善免疫功能的构建尚不得而知。据此,本研究以“法依病机,依法拆方”的方式观察半夏泻心汤及拆方对菌群紊乱幼鼠结肠黏膜免疫屏障的影响,为肠道菌群紊乱相关疾病的中医病机、治法及配伍规律提供思路与方法。

1 材料

1.1 动物 SPF级3~4周龄雄性BALB/c幼鼠70只,体质量(15 ± 2)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2016-0006,饲养于甘肃中医药大学SPF级动物实验中心。本实验经甘肃中医药大学伦理委员会批准(批准号2020-264)。

1.2 药物与试剂 半夏泻心汤药材饮片(法半夏60 g,干姜45 g,黄芩45 g,黄连15 g,人参45 g,大枣20枚,炙甘草45 g)购于甘肃中医药大学附属医院,经甘肃中医药大学景明教授鉴定符合2020年版《中华人民共和国药典》规定。硫酸新霉素、两性霉素B、盐酸万古霉素、甲硝唑、脂多糖(LPS)(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为70210512、511B059、827L021、408Z033、20190430);氨苄西林胶囊(珠海联邦制药股份有限公司中山分公司,批号H44024353);双歧杆菌四联活菌片(杭州远大生物制药有限公司,批号H44024353);多聚甲醛溶液、磷酸盐缓冲液(PBS)、中性树胶、伊红、苏木素、甲苯胺蓝染液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为20191202、20200709、G8590、G1100、G1080、G3665);抗体F4/80(美国Gene Tex公司,批号GTX101895)。

1.3 仪器 KD-BM型包埋机(浙江省金华市科迪仪器);LEICA2016型切片仪(德国Leica公司);ECLIPSE Ti型荧光倒置显微镜(日本Nikon公司);Microfuge 22R型高速冷冻离心机(美国Beckman公司);GR60DA型灭菌锅(宁波市镇海金鑫医疗器械有限公司);T100型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪、ChemiDoc MP数码凝胶图像处理系统(美国Bio-Rad公司);HH-1型恒温水浴锅(常州市江南仪器厂);16SrDNA测序分析由苏州帕诺米克生物医药科技有限公司提供技术支持。

2 方法

2.1 混合抗生素及双歧杆菌四联活菌片药物的配置 将盐酸万古霉素($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、硫酸新霉素($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、两性霉素B($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、氨苄西林($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、甲硝唑($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),与生理盐水混合后制成混合抗生素。参考文献[2]方法,建立抗生素暴露幼鼠模型,按照 $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃体积配比进行配置,各抗生素含药质量浓度依次为5、10、0.1、10、10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。双歧杆菌四联活菌片药物 $0.68 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,与生理盐水混合,按照 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃体积配比进行配置,含药质量浓度为 $68 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.2 半夏泻心汤及配伍组实验用药的制备 按原方剂量称取半夏泻心汤药材饮片,依据配伍法则^[10],将半夏泻心汤拆分为全方组(法半夏60 g,干姜45 g,黄芩45 g,黄连15 g,人参45 g,大枣20枚,炙甘草45 g),辛开组(法半夏60 g,干姜45 g),苦降组(黄芩45 g,黄连15 g),甘补组(人参45 g,大枣20枚,炙甘草45 g)。各组药物饮片先浸泡30 min,

再煎煮2次,第1次加8倍量水,煎煮90 min,第2次加6倍量水,煎煮60 min,合并两次煎液滤过。将滤液减压浓缩至含生药质量浓度为全方组 $0.91 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、辛开组 $0.32 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、苦降组 $0.18 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 及甘补组 $0.41 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3 分组及给药 70只SPF级雄性BALB/c幼鼠,适应性饲养1周后,随机取10只作为空白组,其余幼鼠每12 h给予混合抗生素 $351 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,连续灌胃14 d复制抗生素暴露幼鼠模型^[2],按随机数字表法分为模型组、双歧杆菌四联活菌片组(西药组)、全方组、辛开组、苦降组、甘补组,每组10只。根据参考文献[2]方法及后续16SrDNA菌群结果中模型组及空白组菌群结构差异评判造模是否成功。按照人与动物体表面积折算西药组、全方组、辛开组、苦降组、甘补组幼鼠等效剂量(成人常用剂量 \times 小鼠换算系数9.1)分别为0.68、9.1、3.19、1.82、4.10 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。各组按幼鼠等效剂量连续灌胃给药14 d,1次/d。空白组、模型组给予等体积的生理盐水灌胃。

2.4 16SrDNA检测肠道菌群多样性及结构 末次给药12 h后,无菌收集粪便样本约0.5 mg,置2 mL无菌离心管中, $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,用于16SrDNA测序分析肠道菌群结构。采用Illumina NovaSeq测序平台,提取全基因组DNA。以稀释后的基因组DNA为模板,根据测序区域(16S V4/16S V3/16S V3-V4/16S V4-V5,18S V4/18S V9,ITS1/ITS2, Arc V4)的选择,使用带Barcode的特异引物进行PCR。PCR产物使用2%浓度的琼脂糖凝胶进行电泳检测;使用TruSeq[®] DNA PCR-Free Sample Preparation Kit建库试剂盒进行文库构建,经过Qubit和Real-time PCR定量,文库合格后(检测合格样本量为6,后续实验以每组样本全基因组DNA表达前6的6例样本进行报告),使用NovaSeq6000进行上机测序。采用Uparse算法对所有样本的全部Effective Tags进行聚类,默认以97%的一致性将序列聚类成为微生物16S rRNA基因序列分类单元(OTUs),筛选出现频数最高的序列作为OTUs的代表序列。用Mothur方法与SILVA138^[11]的SSUrRNA数据库^[12]进行物种注释分析(设定阈值为0.8~1)。并根据OTU分类对肠道微生物的物种 β 多样性等进行分析。

2.5 苏木素-伊红(HE)染色及甲苯胺蓝染色检测结肠黏膜组织形态学的变化 末次给药收集粪便6 h后,分别一次性腹腔注射 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的LPS以诱导炎症反应。12 h后脱颈处死,取距离阑尾处约2 cm

近端的结肠组织,用预冷生理盐水冲洗肠腔,多聚甲醛溶液(45 g·L⁻¹)固定 10 h,石蜡包埋,制成厚度约 9 μm 的结肠组织切片,分别行 HE 染色和甲苯胺蓝染色,光学显微镜下观察结肠组织形态学特征及肥大细胞浸润情况。每个标本随机观察 5 个视野,对每个视野采用 Chiu 氏法^[13]进行肠黏膜损伤分级及评分和甲苯胺蓝染色评分。

2.6 免疫组织化学法检测结肠组织巨噬细胞的表达 各组小鼠结肠组织常规石蜡切片脱蜡、水化、抗原修复。3%过氧化氢封闭 20 min(封闭内源性过氧化物酶);PBS 洗涤 3 次;正常血清封闭,滴加正常山羊血清,室温孵育 20 min。弃上清孵育第一抗体(F4/80, 1:200),湿盒中 4 °C 冰箱过夜。37 °C 复苏 35 min。PBS 洗涤 3 次;滴加生物素化的二抗,37 °C,孵育 40 min;PBS 洗涤 3 次;滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液,37 °C 孵育 30 min;洗涤 3 次后,DAB 显色、苏木素复染 2 min,脱水,封片。用 Leica Qwin 图像分析系统随机选取每张切片的 5 个高倍视野(×400)检测,计算 F4/80 双歧杆菌四联活菌片细胞平均积分吸光度 AA。

2.7 Real-time PCR 检测结肠组织炎症因子 mRNA 的表达 称取幼鼠结肠组织 50 mg,加入适量 RNAiso Plus 后匀浆,依次加入氯仿、异丙醇、75%乙醇 1 mL 洗涤沉淀,4 °C、7 500×g 离心 5 min(离心半径 10 cm),弃上清。RNA 纯度检测及定量后去 DNA 处理:42 °C 孵育 2 min。然后使用 5×RT SuperMix 将 RNA 反转录成 cDNA。以反转录得到的 cDNA 作为 Real-time PCR 反应的模板,在 2×S6 Universal SYBR Real-time PCR Mix 体系中进行扩增反应。Real-time PCR 反应条件为 95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 10 s,60 °C 退火/延伸 30 s,循环 40 次。反应结束后确认扩增曲线和融解曲线,确认得出数据的可信性。采用 2^{-ΔΔC_t}法计算 mRNA 的相对表达量。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司设计并合成,见表 1。

2.8 统计学方法 数据采用 SPSS 23.0 进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间两两比较采用 *t* 检验、MetaStat 方法,不同组别对比采用重复测量数据的方差分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 幼鼠一般情况观察 造模前,各自幼鼠精神良好,粪便正常。造模第 5 天,空白组幼鼠体质量呈稳步增长趋势,饮水量、摄食量正常,其余各组幼鼠

表 1 引物序列

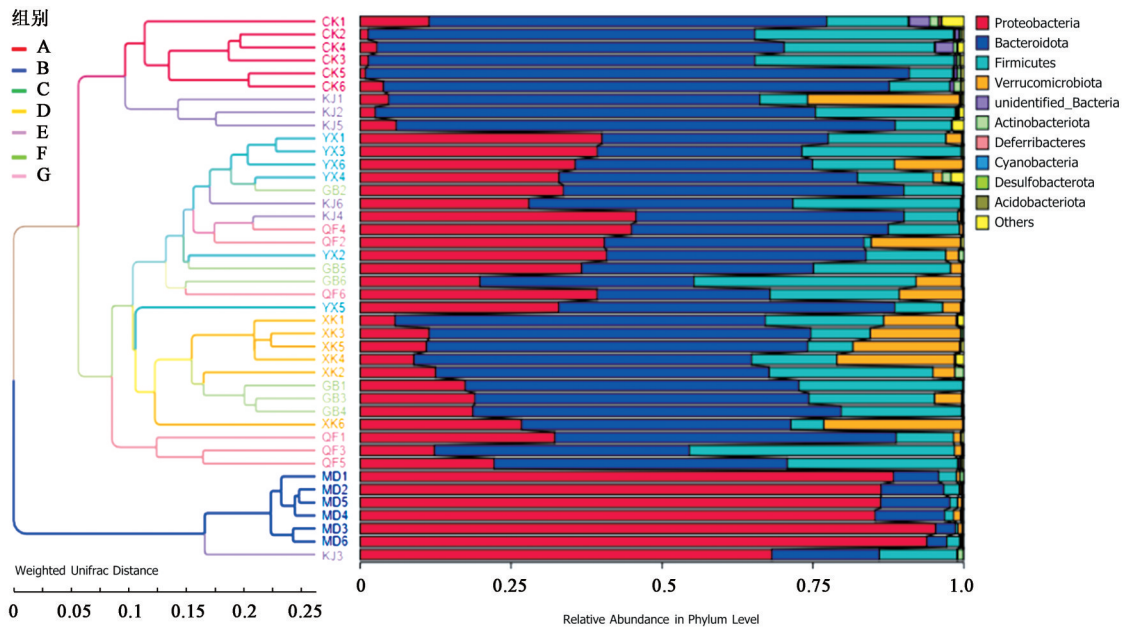
Table 1 Primer sequence

| 引物 | 序列(5'-3') | 长度/bp |
|-------|-----------------------------|-------|
| GAPDH | 上游 AGATCCCTCCAAAATCAAGTGG | 20 |
| | 下游 GGCAGAGATGATGACCCTTTT | 20 |
| IL-1β | 上游 TCCAGGATGAGGACATGAGCAC | 22 |
| | 下游 GAACGTCACACACCAGCAGGTTA | 23 |
| IL-10 | 上游 GCCAGAGCCACATGCTCCTA | 20 |
| | 下游 GATAAGGCTTGGCAACCCAAGTAA | 24 |
| TNF-α | 上游 CCCTTTACTCTGACCCTTTATTGT | 25 |
| | 下游 TGTCCCAGCATCTGTGTTTCT | 22 |
| IL-6 | 上游 CCACTTACAAGTCGGAGGCTTA | 23 |
| | 下游 TGCAAGTGCATCATCGTTGTTTC | 22 |
| IL-8 | 上游 TGGAACCTCAAACCTTGCTC | 20 |
| | 下游 ATCGTTGTTCCCATCCACAT | 20 |

饮水及摄食减少,喜扎堆。造模第 10 天,除空白组外,其余各组幼鼠体质量显著下降,嗜睡,背毛蓬松粗糙且无光泽,并出现大便溏稀,在实验第 14 天时达到最低点。实验第 21 天,即干预治疗第 7 天,空白组幼鼠生长状态良好;模型组幼鼠精神差,嗜睡,饮水量显著减少,生长缓慢;西药组、半夏泻心汤组及各拆方组幼鼠与模型组幼鼠比较,较为活跃,饮食增加,无腹泻。注射 LPS 后各组幼鼠精神萎靡,活动能力减弱,伴腹泻等症状。

3.2 对菌群紊乱幼鼠肠道菌群多样性的影响 构建样本聚类树分析不同样本间的相似性(图 1),采用主坐标分析(PCoA)考察小鼠肠道菌群 Beta 多样性的差异(图 2)。样本距离越接近,表示物种组成结构越相似。各组菌群均相对处于不同区域,表明各组间在肠道菌群结构方面存在差异。基于 PCoA 分析,模型组样本点与空白组样本点完全分开,并且距离最远差异最大,提示抗生素干扰后幼鼠肠道菌群发生了改变,造模成功^[2]。经半夏泻心汤及其拆方组干预后明显缩小了与空白组小鼠肠道菌群的差距,其中以半夏泻心汤全方组最为明显。

3.3 对菌群紊乱幼鼠肠道菌群结构的影响 根据物种注释结果,选取各样品在门水平(Phylum)上最大丰度排名前 10 的物种(OTUs),绘制成物种相对丰度柱形累加图,见图 3。在门水平上,主要以变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidota)、厚壁菌门(Firmicutes)为主。空白组 Bacteroidota、Firmicutes 的相对丰度共占据了 90% 以上。与空白组比较,模型组大鼠丰度减少 (*P* < 0.01),



注: A. 空白组; B. 模型组; C. 西药组; D. 辛开组; E. 苦降组; F. 甘补组; G. 全方组(图2-图6同)

图1 基于weighted UniFrac距离的UPGMA聚类树

Fig. 1 UPGMA clustering tree based on weighted UniFrac distance

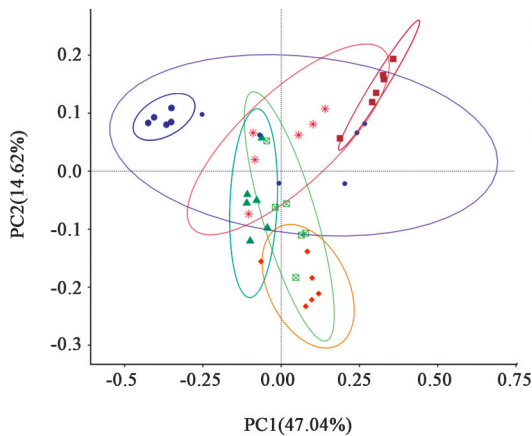


图2 PCOA分析

Fig. 2 PCOA analysis

Proteobacteria 丰度显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 半夏泻心汤及拆方组均能显著降低 Proteobacteria 丰度, 以辛开组最为显著 ($P < 0.01$); 同时半夏泻心汤及拆方组均能显著增加 Bacteroidota、Firmicutes 的丰度 ($P < 0.01$)。其中在增加 Firmicutes 丰度方面, 甘补组最为显著 ($P < 0.01$); 在增加 Bacteroidota 丰度方面辛开组最为显著。见表 2。

3.4 对菌群紊乱幼鼠结肠组织形态及巨噬细胞的表达的影响 HE 染色结果中, 空白组结肠黏膜上皮染色均匀, 结构清晰, 隐窝、腺体完整, 上皮细胞排列整齐, 少见炎性细胞浸润; 模型组肠黏膜相比空白组损伤严重 ($P < 0.01$), 可见大量的炎性细胞, 肠黏膜损伤严重, 腺体消失, 基层可见堆积的大量炎

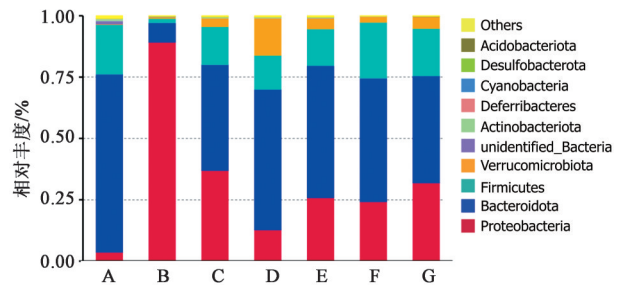


图3 门水平下物种叠加

Fig. 3 stacked histogram of species at phylum level

表2 肠道菌群在门水平上的丰度比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 abundance comparison of intestinal flora at phylum level ($\bar{x} \pm s, n=6$) %

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | Proteobacteria | Firmicutes | Bacteroides |
|-----|-----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 空白组 | | 3.63±0.29 | 20.29±2.40 | 72.51±7.91 |
| 模型组 | | 89.24±4.31 ²⁾ | 1.83±0.61 ²⁾ | 7.88±0.55 ²⁾ |
| 西药组 | 0.68 | 36.95±3.58 ⁴⁾ | 15.55±2.86 ⁴⁾ | 43.09±4.32 ⁴⁾ |
| 辛开组 | 3.19 | 12.75±2.99 ⁴⁾ | 13.97±3.10 ⁴⁾ | 57.21±4.05 ⁴⁾ |
| 苦降组 | 1.82 | 25.86±2.11 ⁴⁾ | 15.03±2.28 ⁴⁾ | 53.80±5.76 ⁴⁾ |
| 甘补组 | 4.10 | 24.23±2.69 ⁴⁾ | 22.88±3.36 ⁴⁾ | 50.28±2.92 ⁴⁾ |
| 全方组 | 9.1 | 31.92±2.82 ⁴⁾ | 19.36±1.78 ⁴⁾ | 43.56±3.51 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3和表4同)

性细胞。与模型组比较, 治疗组黏膜层内隐窝结构损伤程度较轻, 其中, 全方组肠黏膜损伤程度较轻 ($P < 0.01$)。见图4、表3。

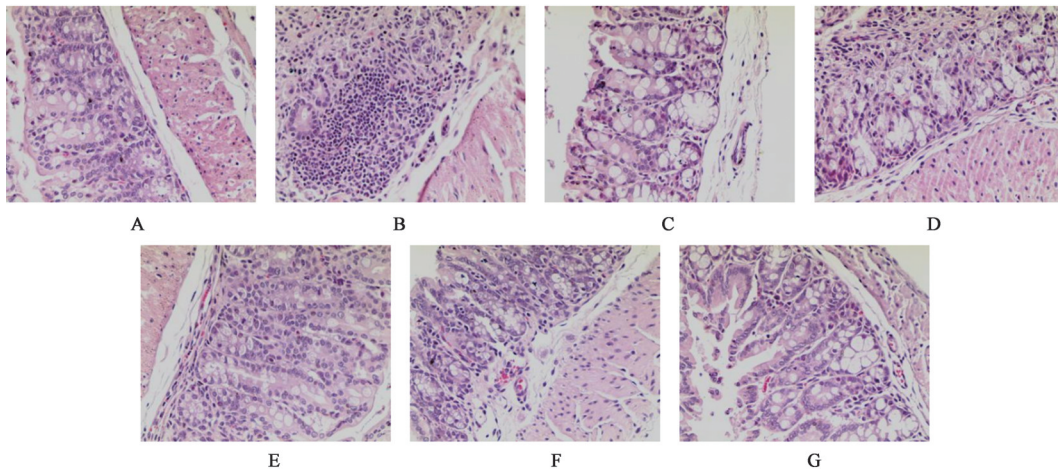


图4 半夏泻心汤及其拆方对菌群紊乱幼鼠结肠组织病理学变化的影响(HE, ×200)

Fig. 4 Effect of Banxia Xiexintang and its removal prescription on histopathological changes of colon in young mice with bacterial community disorder (HE, ×200)

表3 半夏泻心汤及其拆方对菌群紊乱幼鼠结肠组织形态及巨噬细胞表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Banxia Xiexintang and its disassembled prescriptions on colonic tissue morphology and macrophage expression in young rats with flora disorder ($\bar{x} \pm s, n=6$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 结肠肠黏膜损伤评分/分 | 肥大细胞浸润评分/分 | F4/80 AA |
|-----|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 空白组 | | 0.00±0.00 | 1.01±0.13 | 1.00±0.11 |
| 模型组 | | 3.49±0.04 ²⁾ | 0.36±0.10 ²⁾ | 0.30±0.03 ¹⁾ |
| 西药组 | 0.68 | 0.78±0.09 ⁴⁾ | 0.87±0.08 ⁴⁾ | 0.78±0.04 ⁴⁾ |
| 辛开组 | 3.19 | 2.48±0.07 ⁴⁾ | 0.69±0.03 ⁴⁾ | 0.51±0.04 ³⁾ |
| 苦降组 | 1.82 | 1.98±0.03 ⁴⁾ | 0.66±0.06 ⁴⁾ | 0.56±0.03 ⁴⁾ |
| 甘补组 | 4.10 | 2.15±0.03 ⁴⁾ | 0.70±0.04 ⁴⁾ | 0.51±0.04 ³⁾ |
| 全方组 | 9.1 | 1.23±0.18 ⁴⁾ | 0.83±0.08 ⁴⁾ | 0.75±0.03 ⁴⁾ |

内可见明显肥大细胞浸润;与空白组比较,模型组小鼠结肠组织未见明显肥大细胞浸润($P<0.01$);西药组和半夏泻心汤全方组肥大细胞浸润较密集($P<0.01$),辛开组、苦降组和甘补组肥大细胞浸润情况无显著差异。见图5、表3。

免疫组织化学结果显示,空白组可见正常数量F4/80细胞浸润。模型组仅见个别F4/80双歧杆菌四联活菌片细胞,较空白组明显减少,差异具有明显统计学意义($P<0.05$),半夏泻心汤及拆方组幼鼠结肠黏膜组织内有大量F4/80标记的巨噬细胞的浸润。以半夏泻心汤全方组最优($P<0.01$),各拆方组比较,辛开组与甘补组F4/80双歧杆菌四联活菌片细胞光密度值无差别,苦降组优于以上两组,差异具有明显统计学意义($P<0.05$)。见图6、表3。

甲苯胺蓝染色显示,空白组幼鼠结肠黏膜组织

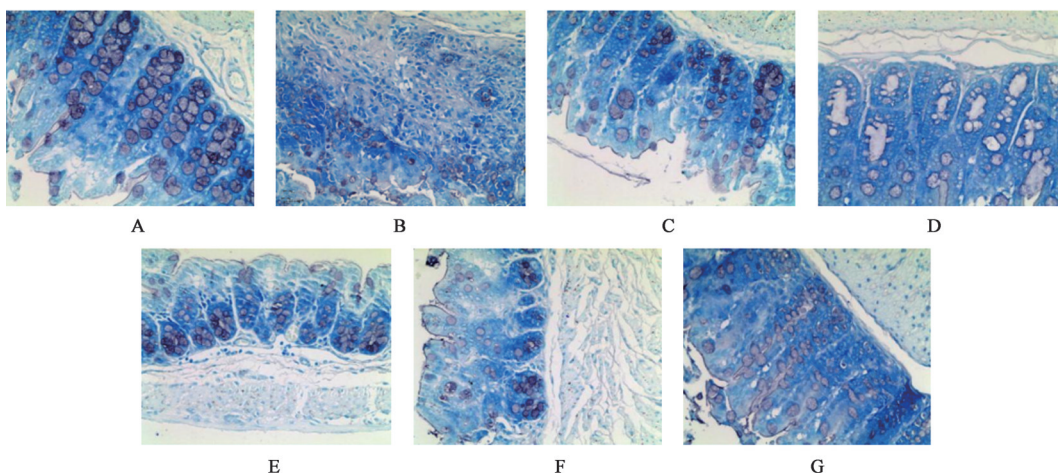


图5 半夏泻心汤及其拆方对菌群紊乱幼鼠结肠组织肥大细胞浸润情况的影响(甲苯胺蓝, ×200)

Fig. 5 Effect of Banxia Xiexintang and its removal prescription on mast cell infiltration in colon tissue of young mice with bacterial community disorder (toluidine blue, ×200)

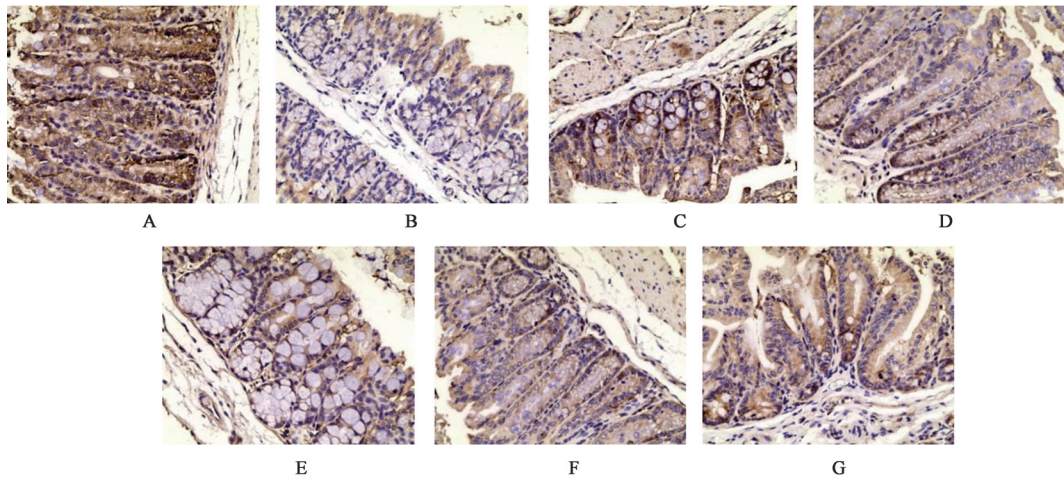


图6 半夏泻心汤及其拆方对菌群紊乱幼鼠结肠组织巨噬细胞表达的影响(免疫组化,×200)

Fig. 6 Effect of Banxia Xiexintang and its disassembled formula on expression of macrophages in colonic tissue of young rats with flora disorder (IHC,×200)

3.6 对菌群紊乱幼鼠结肠组织炎症因子 mRNA 表达的影响 与空白组比较,模型组幼鼠结肠组织炎症因子 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 和 IL-10 mRNA 表达均显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,西药组、半夏泻心汤及其拆方组 TNF- α 、IL-6、IL-8 的含量均显著增加($P<0.01$);西药组、半夏泻心汤及苦降、甘补

组升高 IL-1 β mRNA 表达($P<0.01$);西药组、半夏泻心汤及辛开、甘补组升高 IL-10 mRNA 表达($P<0.05, P<0.01$)。炎症因子总体表达情况以全方组和甘补组最为显著,辛开组显著性低。其中,辛开组 IL-1 β mRNA、苦降组 IL-10 mRNA 表达与模型组比较,差异无统计学意义。见表4。

表4 半夏泻心汤及其拆方对菌群紊乱幼鼠结肠组织炎症因子 mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Banxia Xiexintang and its disassembled prescriptions on expression of inflammatory factor mRNA in colon tissue of young rats with flora disorder ($\bar{x}\pm s, n=6$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | IL-1 β | IL-6 | IL-8 | IL-10 | TNF- α |
|-----|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 空白组 | | 1.01±0.14 | 1.01±0.13 | 1.00±0.09 | 1.00±0.11 | 1.01±0.17 |
| 模型组 | | 0.45±0.04 ²⁾ | 0.36±0.01 ²⁾ | 0.32±0.02 ²⁾ | 0.41±0.05 ²⁾ | 0.31±0.01 ²⁾ |
| 西药组 | 0.68 | 0.77±0.09 ⁴⁾ | 0.87±0.08 ⁴⁾ | 0.82±0.13 ⁴⁾ | 0.87±0.09 ⁴⁾ | 0.81±0.04 ⁴⁾ |
| 辛开组 | 3.19 | 0.56±0.03 | 0.69±0.03 ⁴⁾ | 0.74±0.02 ⁴⁾ | 0.58±0.06 ³⁾ | 0.61±0.03 ⁴⁾ |
| 苦降组 | 1.82 | 0.63±0.02 ⁴⁾ | 0.66±0.06 ⁴⁾ | 0.69±0.16 ⁴⁾ | 0.55±0.10 | 0.55±0.05 ⁴⁾ |
| 甘补组 | 4.10 | 0.68±0.03 ⁴⁾ | 0.70±0.04 ⁴⁾ | 0.63±0.05 ⁴⁾ | 0.68±0.03 ⁴⁾ | 0.66±0.06 ⁴⁾ |
| 全方组 | 9.1 | 0.72±0.07 ⁴⁾ | 0.83±0.08 ⁴⁾ | 0.85±0.04 ⁴⁾ | 0.79±0.12 ⁴⁾ | 0.73±0.05 ⁴⁾ |

4 讨论

生命早期阶段的婴幼儿具有“脏腑娇嫩、形气未充”的生理特点和“易虚易实,易寒易热”的病理特点。抗生素滥用是此阶段诱发肠道菌群紊乱的主要干扰因素,由于菌群微生态失衡,使得通过肠道菌群构建免疫屏障的能力缺失^[14],极易引发呼吸道、消化道感染等菌群紊乱相关疾病^[15]。近年来,临床小儿抗生素相关性肠道疾病发生率有逐年升高的趋势,抗生素使用后出现的证候群,多属于中医学寒热错杂证,半夏泻心汤为寒热并用,辛开苦降的代表方剂,方证对应,故有是证用是方。同时

半夏泻心汤可以改善炎症性肠病等引起的肠黏膜受损^[16],提高机体免疫机能、减轻炎症反应,保护胃肠黏膜^[17]。据此,为了深入研究半夏泻心汤对肠道菌群失调的调整及对肠黏膜屏障受损的保护作用,本课题开展了相关研究。

半夏泻心汤是寒热并用,辛开苦降的代表方剂,从中医病机、治法及配伍规律的角度,可将半夏泻心汤拆分为半夏、干姜的辛开(散寒)配伍单元,黄芩、黄连的苦降(清热)配伍单元及人参、大枣、甘草的甘补(补脾)配伍单元,不同的配伍单元反映了不同的中医病机与治法。通过这种方式开展方剂

作用机制的研究,对深入探讨某种疾病或其某一阶段的病机、治法、配伍规律具有重要意义。

本实验在对肠道微生物群落结构的系统分析中,笔者发现幼鼠暴露抗生素后肠道菌群丰度、多样性差异显著,菌群结构在干预前后明显不同。空白组幼鼠肠道菌群门水平上拟杆菌(72.51%)和厚壁菌(20.29%)最为丰富,这一发现与已有研究报告一致^[18];抗生素暴露后,模型组肠道菌群丰度较高的菌群主要包括变形杆菌(89.24%)、拟杆菌(7.88%)、厚壁菌(1.82%);在半夏泻心汤及各拆方干预治疗后,门水平肠道菌群结构发生不同程度的改变,Proteobacteria平均丰度下降,以辛开组最为显著;Bacteroidota、Firmicutes的含量显著增加,其中在增加Firmicutes丰度方面,甘补组最为显著;在增加Bacteroidota丰度方面辛开组最为显著。Proteobacteria增加是肠道微生物群落失调的标志,与健康受试者相比,IBD患者的肠道微生物群落变形菌增多、微生物多样性低,并伴随Firmicutes耗竭的特点^[19]。本研究结果提示,半夏泻心汤中各拆方组对于不同菌群类型的调节具有明显的差异性,其中“辛开”组可有效降低致病菌丰度,提升拟杆菌比例,在调节菌群平衡上更具优势;“甘补”组则可有效增加益生菌Firmicutes类丰度。而对于抗生素暴露后的急性炎症反应,HE染色及结肠肠黏膜损伤评分结果表明,与模型组比较,半夏泻心汤全方组在一定程度上具有减轻结肠粘膜组织损伤的优势。

F4/80是一种细胞表面糖蛋白,表达于多种成熟的巨噬细胞中,在巨噬细胞的成熟和活化过程中,F4/80蛋白的表达发生明显变化,该蛋白的表达一定程度反映了免疫系统的应答。实验结果显示除模型组外,其余各组幼鼠结肠黏膜组织内有大量F4/80标记的巨噬细胞的浸润。同时,炎症反应也是机体免疫反应的重要体现,IL-1 β 、IL-6、IL-8和TNF- α 被认为是反映炎症反应严重程度的促炎因子指标,IL-10为抗炎因子指标,这些因子在肠道疾病的发生和发展中起着至关重要的作用,与肠道基质退化、上皮损伤、内皮活化和血管中断等功能相关^[20-21]。本研究发现,经LPS诱导刺激后,菌群紊乱幼鼠IL-10、IL-1 β 、IL-6、IL-8和TNF- α 炎症因子表达明显下降,表明菌群紊乱幼鼠导致肠道免疫应答下降,破坏了肠屏障建立并使得功能损伤,进而在出现明显炎症损伤的同时,各炎症因子表达出现下降趋势,该趋势与相关研究报道的结果基本符合^[2]。通过半夏泻心汤及其拆方干预后,IL-10、IL-1 β 、IL-6、

IL-8和TNF- α 的水平较模型组明显增加,以半夏泻心汤全方组最为显著,提示半夏泻心汤及其拆方可改善菌群紊乱幼鼠导致的肠黏膜低免疫应答状态。

综上,本研究证实了生命早期阶段肠道菌群紊乱可影响结肠黏膜免疫反应,半夏泻心汤中“甘补”及“辛开”配伍单元对于菌群平衡发挥核心作用,而在保护结肠黏膜病理损伤及改善免疫反应方面半夏泻心汤全方更具显著优势,提示中药复方配伍具有复杂机制及各自的特异性靶位。同时本研究为半夏泻心汤全方配伍防治肠上皮屏障损伤相关胃肠道疾病的可行性与合理性提供了科学依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 詹妮,崔文静,金玉芬,等. 肠道微生态失衡在代谢综合征发病机制中的研究[J]. 中国实验诊断学,2021,25(8):1256-1259.
- [2] 郭宏伟,张妮妮,张伟,等. 抗生素诱导的菌群紊乱对幼鼠结肠黏膜屏障及免疫反应的影响[J]. 中华实用儿科临床杂志,2019,34(7):505-509.
- [3] 李玉丽,袁振仪,谭周进. 泄泻证候相关肠道菌群的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(16):209-217.
- [4] 张庚鑫,杜海洋,王平,等. 基于16SrRNA测序研究葛根芩连汤对菌群失调性腹泻大鼠肠道菌群结构的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(11):19-26.
- [5] 陈茹琴. 半夏泻心汤合四逆散治疗菌群失调性肠炎12例[J]. 中医杂志,2004,45(1):38-38.
- [6] 朱春亮. 半夏泻心汤加黄芪治疗寒热错杂型腹泻型肠易激综合征的临床研究[D]. 福州:福建中医药大学,2019.
- [7] 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.
- [8] 崔国宁,刘喜平,王磊,等. 半夏泻心汤治疗胃肠道疾病研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2019,21(6):87-90.
- [9] 张映红,戴丽蓉,陈启明,等. 半夏泻心汤及不同配伍对抗生素诱导的菌群紊乱幼鼠结肠黏膜屏障的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2021, doi: 10.19879/j.cnki.1005-5304.202110186.
- [10] 邓中甲. 方剂学[M]. 北京:中国中医药出版社,2003:88.
- [11] EDGAR R C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. Nat Methods,2013,10(10):996-998.
- [12] WANG Q, GARRITY G M, TIEDJE J M, et al. Naive

- bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [13] 张艳. 半夏泻心汤及拆方对溃疡性结肠炎大鼠 Th1/Th2 细胞因子的影响[D]. 青岛: 山东中医药大学, 2015.
- [14] 陈红苓, 徐俊杰. 肠道菌群变化对肠道免疫的影响及与小儿迁延性、慢性腹泻的关系[J]. 中国妇幼保健, 2019, 34(7): 1690-1692.
- [15] 王娟, 范雅廷, 董小英. NICU 新生儿院内感染危险因素和病原菌分布情况[J]. 中国妇幼保健, 2021, 36(5): 1136-1139.
- [16] 陈茹琴. 半夏泻心汤合四逆散治疗菌群失调性肠炎 12 例[J]. 中医杂志, 2004, 45(1): 38-38.
- [17] 黄彦平, 詹达法, 黄海, 等. 半夏泻心汤人含药血清对 HP 感染 GES-1 细胞 TGF- β /Smad 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(14): 91-96.
- [18] LU W W, FU T X, WANG Q, et al. The effect of total glucoside of paeony on gut microbiota in NOD mice with Sjogren's syndrome based on high-throughput sequencing of 16SrRNA gene[J]. Chin Med, 2020, 15(7): 61.
- [19] SHIN N R, WHON T W, BAE J W. Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota[J]. Trends Biotechnol, 2015, 33(9): 496-503.
- [20] YE M, JOOSSE M E, LIU L, et al. Deletion of IL-6 exacerbates colitis and induces systemic inflammation in IL-10-deficient mice[J]. J Crohns Colitis, 2020, 14(6): 831-840.
- [21] 杜小梅, 潘薇, 梁颖兰, 等. 参芪地黄汤加减治疗气阴两虚型糖尿病肾病疗效观察及对肠道菌群和炎症因子的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(4): 566-572.

[责任编辑 孙丛丛]

· 书讯 ·

脑出血后高血压采用卡托普利缓释片的治疗分析 ——评《新编上海药物实用手册》

脑出血为脑部血管破裂出血,是由于非外伤性脑实质内小动脉发生病理变化所致。临床上认为诱发该病症的高危因素为高血脂、糖尿病高血压及血管老化,往往会在患者情绪较为激动时造成突然性的发病。脑出血病死率较高,经治愈后的幸存者可能会存有多种并发症,例如脑出血后高血压。患脑出血后会出现血压明显升高,这不仅会对患者的预后造成影响,严重者甚至会造成二次脑出血,所以对于脑出血的后期治疗较为重要的是合理控制患者血压情况。应用卡托普利缓释片治疗脑出血后高血压效果显著,主要是通过抑制血管紧张素 II 的生成,使血管保持舒张,以此达到降低血压的作用。当然,脑出血术后的患者仍处于危险期,实施良好的护理措施在治疗期间是一项必要的工作,这要求医护人员对患者生命体征的变化进行严密观察,出现任何异常情况时做到及时告知主治医生。

《新编上海药物实用手册》由陈统辉,沈芸荪主编,同济大学出版社 2006 年出版。本书是一部实用型的药物参考书,整本书共收录 2 353 种涵盖原料药、药用辅料、制剂及中成药等,涉及内容广而全面。全书共分为二十二个章节,涉及抗感染药、神经系统药、麻醉药、心血管系统药等。其中,第五章为心血管系统药和利尿药,细分为 5 个小节,第四节对降血压药和周围血管扩张药展开了合理解析,让读者对药物剂型、药物药理作用、制备过程等基本知识有所了解,卡托普利缓释片在第四节中有所描述,将该药物涉及的相关知识进行细致阐述,有助于突出其药效在治疗脑出血后高血压的优势,促使制药过程的优化考虑。卡托普利缓释片属于缓释制剂,在制备卡托普利缓释片有羟丙基甲基纤维素、黄原胶、乙基纤维素等多种不同的缓释材料,且每种制备工艺路线存在优劣势,制药人员对填充剂的筛选也有着极高的要求,选择羟丙基甲基纤维素作为缓释材料,最优的工艺路线是粉末直接压片法,乳糖为填充剂的制备过程可以保证持续释放药物延长药物作用。目前临床上治疗高血压的常用药物为卡托普利缓释片,与其他降压药相比,更突出的作用是能够有效缓解高血压患者血管壁增厚及心肌肥大的现象,达到对心脏的保护作用,与此同时对于心功能不全及高血压肾病方面也有所改善。该药物是通过影响竞争性血管紧张素使其转变为酶抑制剂,保证患者血管紧张素不转换为血管紧张素 II,以血管紧张素 I 的作用存在,进而使外周血管的阻力降低,改善醛固酮分泌的效果,达到改变水钠潴留的现象。而且卡托普利缓释片还可通过干扰缓激肽的降解扩张外周血管的作用,可有针对性的改善脑出血后的血压值水平。当然临床护理在任何临床治疗中都体现着较为重要的作用。在脑出血后高血压实施的护理措施中,一般以基础常规护理为主,该护理模式缺乏针对性,主要是护理和治疗脑出血症状,从临床效果来看,造成部分患者出现脑出血的其中因素也跟心理护理有关。因此要求护理人员要通过积极的心理和康复护理措施等在患者接受治疗时进行护理干预,密切留意其生命体征指标及呼吸道是否通畅等。脑出血后高血压患者会存在不同程度的生理和心理的损伤,所以在护理和治疗脑出血后高血压患者时应用适当的心理沟通和有效的疏导工作,当然还需要配合合理的康复训练,也可减少高血压患者的急性发作程度。医护人员需要正确引导家属和患者,让情绪尽量稳定,在家属和护士的护理与配合下,可达到护理措施的最佳效果,有助于提高药物治疗的效果,使患者能够早日康复,顺利出院。

《新编上海药物实用手册》根据各类疾病展开详细的药物解析,让读者充分掌握药品知识,便于读者进行选择性的翻阅。通过对此书的阅读和学习,可全面提升读者对每一类药物的历史发展过程,是广大临床药师和药物研究学者的必阅参考书籍。

(作者张慧娟,候青,郝敏丽*, 张家口市第一医院,河北 张家口 075000)