

黄芩汤对溃疡性结肠炎小鼠肠道菌群的影响及肠黏膜屏障的保护作用机制

刘雅清¹, 徐航宇¹, 王敦方¹, 刘滨², 马旭冉¹, 冯雪^{1*}, 杨伟鹏^{1*}

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:研究黄芩汤对溃疡性结肠炎(UC)模型小鼠的药效,并探究黄芩汤在UC中是否能调节肠道菌群,发挥屏障保护作用。方法:雄性Balb/c小鼠按体质量随机分为正常组、模型组、黄芩汤高(20 g·kg⁻¹)、中(10 g·kg⁻¹)、低(5 g·kg⁻¹)剂量组、菌群干扰组、菌群干扰模型组、菌群干扰黄芩汤组(黄芩汤, 20 g·kg⁻¹)。灌胃抗生素(杆菌肽 200 mg·kg⁻¹、万古霉素 200 mg·kg⁻¹)8 d构建菌群干扰模型,自由饮用3%葡聚糖硫酸钠(DSS)溶液7 d构建UC模型,黄芩汤给药治疗7 d。实验结束后处死小鼠,取血、结肠及粪便,苏木素-伊红(HE)染色观察结肠病变,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测结肠组织中紧密连接蛋白1(Claudin1)、黏蛋白1(MUC1)、咬合蛋白(Occludin)、闭锁小带蛋白-1(ZO-1) mRNA和蛋白的表达,提取小鼠粪便DNA进行高通量测序分析。结果:与正常组比较,模型组小鼠血清IL-4、IL-6、TNF- α 含量明显升高($P<0.05$, $P<0.01$), IL-10明显降低($P<0.05$);与模型组比较,黄芩汤给药组IL-4、IL-6、TNF- α 含量下降($P<0.05$, $P<0.01$), IL-10含量显著上升($P<0.01$), Claudin1、MUC1、Occludin、ZO-1 mRNA和蛋白表达明显上升($P<0.05$, $P<0.01$)。菌群干扰后,小鼠肠道菌物种多样性及丰度降低,变形菌门(Proteobacteria)增多($P<0.01$),厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)减少($P<0.01$);DSS诱发UC后,拟杆菌门和柔壁菌门(Tenericutes)明显减少($P<0.05$);黄芩汤高、中、低3个剂量组中拟杆菌门、柔壁菌门明显增多($P<0.05$, $P<0.01$),厚壁菌门减少($P<0.05$),乳酸菌属(*Lactobacillus*)、毛螺菌属(*Lachnospiraceae NK4A136 group*)、大肠埃希菌志贺属(*Escherichia-Shigella*)、螺杆菌(*Helicobacter*)的丰度与黄芩汤剂量呈正比。结论:黄芩汤可以抑制UC小鼠的炎症反应,回调失衡的肠道菌群,修复损伤的肠黏膜屏障。

[关键词] 黄芩汤; 溃疡性结肠炎; 肠道菌群; 肠黏膜屏障

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)07-0011-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20222005 **[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.20221110.2132.003.html>

[网络出版日期] 2022-11-11 14:27:45

Effect of Huangqintang on Intestinal Flora in Mice with Ulcerative Colitis and Its Protective Mechanism on Intestinal Mucosal Barrier

LIU Yaqing¹, XU Hangyu¹, WANG Dunfang¹, LIU Bin², MA Xuran¹, FENG Xue^{1*}, YANG Weipeng^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the pharmacodynamic effect of Huangqintang (HQT) on ulcerative colitis (UC) model mice and investigate its protective effect against UC by regulating intestinal flora. **Method:** Male Balb/c mice were randomly divided into control group, model group, high-, medium-, and low-dose HQT groups (20, 10, 5 g·kg⁻¹), flora interference group, flora interference model group, and flora interference-drug

[收稿日期] 2022-08-21

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473592, 82074328, 81273662);中国中医科学院中药研究所自主申报项目(ZXKT20033)

[第一作者] 刘雅清,在读硕士,从事中药药理学研究, E-mail: 991106949@qq.com

[通信作者] * 冯雪,博士,助理研究员,从事中药药理学、中药新药及保健食品研发, E-mail: 15227180242@163.com;

* 杨伟鹏,博士,研究员,博士生导师,从事中药药理学研究, E-mail: wpyang@icmm.ac.cn

treatment group (HQT, 20 g·kg⁻¹). The flora interference model was constructed through intragastric administration of antibiotics (200 mg·kg⁻¹ bacitracin and 200 mg·kg⁻¹ vancomycin) for 8 d, and the UC model was constructed by allowing mice with free access to 3% dextran sulfate sodium (DSS) solution for 7 d. HQT was administered for 7 d. After the experiments, the mice were sacrificed, and blood, colon, and feces were collected. Hematoxylin-eosin (HE) staining was performed to observe the colonic lesions. The serum levels of interleukin (IL) -4, IL-6, IL-10, and tumor necrosis factor (TNF) - α were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA and protein expression of Claudin1, MUC1, Occludin, and zonula occludens-1 (ZO-1) in colon tissues was detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot, respectively. The fecal DNA of mice was extracted and analyzed by high-throughput sequencing. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed increased serum content of IL-4, IL-6, and TNF- α ($P<0.05$, $P<0.01$) and decreased IL-10 ($P<0.05$). Compared with the model group, the HQT groups displayed decreased serum levels of IL-4, IL-6, and TNF- α ($P<0.05$, $P<0.01$), increased IL-10 content ($P<0.01$), increased mRNA and protein expression levels of Claudin1, MUC1, Occludin, and ZO-1 ($P<0.05$, $P<0.01$). After flora interference, the diversity and abundance of intestinal bacteria decreased. To be specific, Proteobacteria increased ($P<0.01$), and Firmicutes and Bacteroidetes decreased ($P<0.01$). After UC induction by DSS, Bacteroidetes and Firmicutes decreased ($P<0.05$). The high-, medium-, and low-dose HQT groups showed increased Bacteroidetes and Firmicutes ($P<0.05$, $P<0.01$) and decreased Firmicutes ($P<0.05$). Additionally, the abundance of *Lactobacillus*, *Lachnospiraceae NK4A136 group*, *Escherichia-Shigella*, and *Helicobacteris* was positively proportional to the dose of HQT. **Conclusion:** HQT can inhibit the inflammatory response of UC mice, restore the imbalance of intestinal flora, and repair the damaged intestinal mucosal barrier.

[Keywords] Huangqintang; ulcerative colitis; intestinal flora; intestinal mucosal barrier

溃疡性结肠炎(UC)是一种炎症性肠病(IBD),以持续黏膜炎症为特征,典型的表现症状包括腹泻、黏液脓血便、腹痛等^[1]。UC的发病机制尚不完全清楚,目前多认为肠道内共生菌群对免疫系统不适当的激活是本病的基础^[2]。已有临床研究证实,UC患者与正常人比较,肠道内生物多样性减少,且致炎菌数量增加,抑炎菌数量减少^[3],通过粪菌移植等手段改善菌群结构可显著改善临床症状^[4]。因此,肠道微生物群结构的变化对炎症性肠病的发作和治疗有着重要影响。菌群紊乱引起的炎症反应会逐渐降解肠上皮细胞,致使更多的抗原泄漏,加剧炎症,进一步损害肠黏膜屏障的完整性^[5]。咬合蛋白(Occludin)、紧密连接蛋白(Claudins)、黏蛋白(MUC)、闭锁小带蛋白(ZOs)是肠黏膜屏障的标志蛋白,其中MUC属于黏蛋白,参与构成肠道内的黏液层,保护肠上皮细胞和底层免疫系统免受细菌的错误激活^[2]。Occludin、Claudins、ZOs属于紧密连接蛋白,参与构成肠道内机械屏障,阻碍致病菌及有害产物进入^[6]。

中医将UC归于“痢疾”和“泄泻”两大范畴,黄芩汤出自《伤寒论》,有“万世治痢之祖方”之名。黄

芩汤具有抗炎、抗氧化应激等作用,可以下调UC模型大鼠体内前列腺素E₂(PGE₂)、一氧化氮(NO)、白细胞介素-17(IL-17)等炎性因子含量,改善结肠病变损伤^[7-8]。课题组前期研究亦证实,UC的大鼠肠道菌群出现物种多样性及丰度下降的情况,而给予黄芩汤后情况有所改善^[9-10],但菌群失调与UC之间的相互作用仍有待进一步研究。本研究基于16S RNA高通量测序技术,通过肠道菌群干扰及葡聚糖硫酸钠(DSS)构建UC小鼠动物模型,探究黄芩汤在UC中是否通过调节肠道菌群发挥屏障保护作用。

1 材料

1.1 动物 8周龄雄性SPF级Balb/c小鼠,共80只,体质量18~20 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)2017-0023。饲养于GLP清洁级动物房,温度(23±1.5)℃,湿度45%±15%,昼夜交替的标准环境。实验方案由中国中医科学院中药研究所伦理委员会批准,编号2020B082。

1.2 药物与试剂 黄芩、白芍、炙甘草、大枣购自北京华邈药业有限公司,批号分别为DC9201、

DC6071、DC2231、DC5021。经中国中医科学院中药研究所李先端研究员鉴定为合格药材后,于干燥室温贮存。上述药材按照3:2:2:2的质量比配伍,加入10倍体积的水,煎煮1 h后,趁热过滤药液;加8倍体积的水继续煎煮1 h,合并2次滤液并浓缩,浓缩后得到药液质量浓度为 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的黄芩汤。DSS(美国MP公司,货号0216011080),杆菌肽、万古霉素(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为B8181、V8050),苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号G1120),IL-4、IL-6、IL-10、TNF- α 酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(美国R&D公司,货号分别为M4000B、M6000B、M1000B、MTA00B),Total RNA提取试剂、TB Green[®] Premix DimerEraser[™](日本Takara公司,货号分别为9108、RR091A),二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(北京康为试剂生物科技有限公司,货号CW0014),新快速SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(北京庄盟国际生物基因科技有限公司,货号ZD304A),兔抗鼠Claudin1、MUC1、Occludin、ZO-1、 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体和山羊抗兔荧光二抗(美国Abcam公司,货号分别为ab180518、ab45167、ab167161、ab96587、ab8226、ab97051),DNA提取试剂盒(美国Omega生物技术公司,货号D4035)。

1.3 仪器 BDS系列倒置生物显微镜(重庆奥拓公司),Multiskan FC型酶标仪(美国Thermo Fisher公司),Varioskan Flash型全波长自动扫描仪(美国Thermo公司),ABI GeneAmp[®]9700型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国ABI公司),MISEQ型测序仪(美国Illumina公司),PowerPac[™] Basic型电源、Mini PROTEAN[®] Tetra Cell型电泳槽(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 造模与取样 小鼠适应性饲养1周后,按体重随机分为正常组、模型组、黄芩汤高剂量组、黄芩汤中剂量组、黄芩汤低剂量组、菌群干扰组、菌群干扰模型组、菌群干扰黄芩汤组。

菌群干扰组、菌群干扰模型组与菌群干扰黄芩汤组小鼠在造模的第1~8天每日定时灌胃给予混合抗生素(杆菌肽 $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、万古霉素 $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),制备肠道菌群干扰模型,其余各组灌胃蒸馏水。黄芩汤高、中、低剂量组与菌群干扰黄芩汤组在造模的第9天起自由饮用3% DSS溶液,连续7 d,制备UC模型,并从自由饮用DSS溶液的第5天,即造模第13天起每日给予黄芩汤治疗,持

续1周。其中黄芩汤高、中、低剂量分别以 20 、 10 、 $5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量灌胃给药,菌群干扰黄芩汤组按高剂量给药。模型组与菌群干扰模型组同样于造模第9天开始自由饮用3% DSS溶液,连续7 d,并于造模的第13天起每日以蒸馏水灌胃7 d。正常组从造模开始每日灌胃蒸馏水至造模结束,持续19 d。

菌群干扰组小鼠于第8天处死。处死前用代谢笼采集小鼠新鲜粪便3~5粒,立即放入灭菌后的离心管中,超低温保存,以备肠道菌群分析。其余各组末次给药后禁食不禁水18 h,眼眶静脉丛取血后处死小鼠。取出自肛门至回盲部处结肠组织,沿肠系膜缘剪开肠腔,收集内容物,剪为2段,一段冻存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$,另一段置于4%多聚甲醛中固定,待进行常规病理切片及染色。

2.2 行为学检测 记录小鼠每日体质量变化,观察粪便形态及颜色。

2.3 HE染色检测结肠组织病理变化 按常规方法将结肠组织包埋、切片,厚度 $5\text{ }\mu\text{m}$ 。进行HE染色,高倍镜下观察。根据炎症细胞浸润程度、内部结构损伤程度等比较各组结肠病变程度。

2.4 ELISA检测血清中IL-4、IL-6、IL-10、TNF- α 含量 根据说明书操作并计算结果,结果以每种炎症因子的浓度表示。

2.5 Real-time PCR检测Claudin1、MUC1、Occludin、ZO-1 mRNA表达 使用TRIzol法提取RNA,分别测定细胞总RNA在260 nm和280 nm处的吸光度 A ,计算RNA的含量和纯度。按照TaKaRa反转录试剂盒说明书进行逆转录后得到cDNA,按 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,1个循环; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性3 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s,40个循环的步骤进行反应,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,测定结肠组织中Claudin1、MUC1、Occludin、ZO-1 mRNA的表达。引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司设计并合成,引物序列见表1。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测Claudin1、MUC1、Occludin、ZO-1蛋白表达 使用裂解液提取细胞总蛋白,BCA法测定蛋白浓度,加入SDS-PAGE蛋白上样缓冲液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,转膜并封闭,稀释抗体Claudin1、MUC1、Occludin、ZO-1至滴度为1:1 000, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,加入HRP标记的二抗(1:5 000)孵育2 h,显影,用Image J图像分析软件进行目的条带灰度值分析。

2.7 高通量测序检测肠道菌群组成结构与丰度差异 按照DNA提取试剂盒说明书步骤提取小鼠

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度 /bp
Claudin1	上游 AGAAGATGTGGATGGCTGTCATTGG	251
	下游 CCGTGGTGTGGGTAAGAGGTTG	
MUC1	上游 AGCCACCAGTCCAGACCACAG	161
	下游 TAGGTAGCACCGAGGAGCCATTG	
Occludin	上游 TGGCTATGGAGGCGCTATGG	119
	下游 TTACTAAGGAAGCGATGAAGCAGAAGG	
ZO-1	上游 CATAAGGAGGTAGAACGAGGCATCATC	186
	下游 TTGAAGTGGCTGAGCTGACAAGTC	
GAPDH	上游 AGGTGGTGAAGCAGGCATCT	113
	下游 GGCATCGAAGGTGAAGAGT	

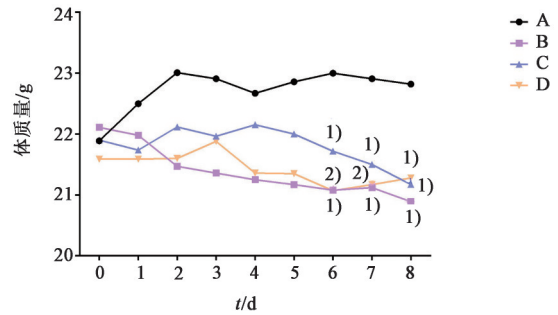
粪便DNA。选定16S rDNA的V3~V4可变区,PCR扩增测序区域,反应体系为20 μL(扩增条件为95 °C解链3 min,95 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 45 s,25个循环,72 °C延伸10 min,引物序列338F 5'-ACTCCTACGGAGGCAGCAG-3',806R 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')。扩增过程重复3次。使用IlluminaMiSeq测序平台进行双末端测序,并使用UPARSE 7.1软件聚类生成操作分类单元(OUT),相似度为97%。silva(SSU11516S)核糖体RNA数据库进行分类学比对,算法为RDP Classifier,置信阈值为70%。

2.8 统计学处理 采用SPSS 20.0软件进行统计分析,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,数据符合正态分布且方差齐时采用单因素方差分析,否则用秩和检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义,生物信息部分使用R语言工具统计并作图,同时采用GraphPad Prism 6软件制图。

3 结果

3.1 对UC小鼠行为学结果的影响 与正常组比较,制备菌群干扰模型期间,给予抗生素的3组小鼠自主活动减少,进食、饮水量减少,体质量下降;制备UC模型期间,饮用DSS的小鼠体质量下降,出现软便,1周后肉眼可见血便,经过菌群干扰的小鼠比未灌胃抗生素的小鼠更早出现上述症状。黄芩汤高、中、低剂量给药后,稀便、便血情况得到改善。小鼠体质量变化见图1和图2。

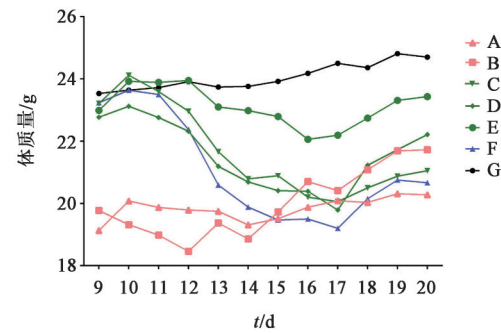
3.2 对UC小鼠结肠组织病理学检查的影响 肉眼观察结肠组织,正常组小鼠结肠未见明显充血,粪便成型。与正常组比较,模型组小鼠结肠明显缩短,可见充血与肿胀,粪便不成型且充满黄色黏液



注:A.正常组;B.菌群干扰组;C.菌群干扰模型组;D.菌群干扰黄芩汤组;与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$

图1 0~8 d各组体质量变化(n=10)

Fig. 1 Body weight change at 0-8 d (n=10)

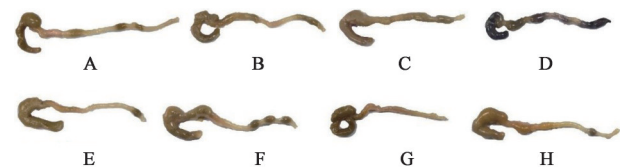


注:A.菌群干扰模型组;B.菌群干扰黄芩汤组;C.黄芩汤高剂量组;D.黄芩汤中剂量组;E.黄芩汤低剂量组;F.模型组;G.正常组

图2 9~20 d各组体质量变化(n=10)

Fig. 2 Body weight change at 9-20 d (n=10)

或血便。菌群干扰组小鼠的盲肠相比正常组明显增大。见图3。



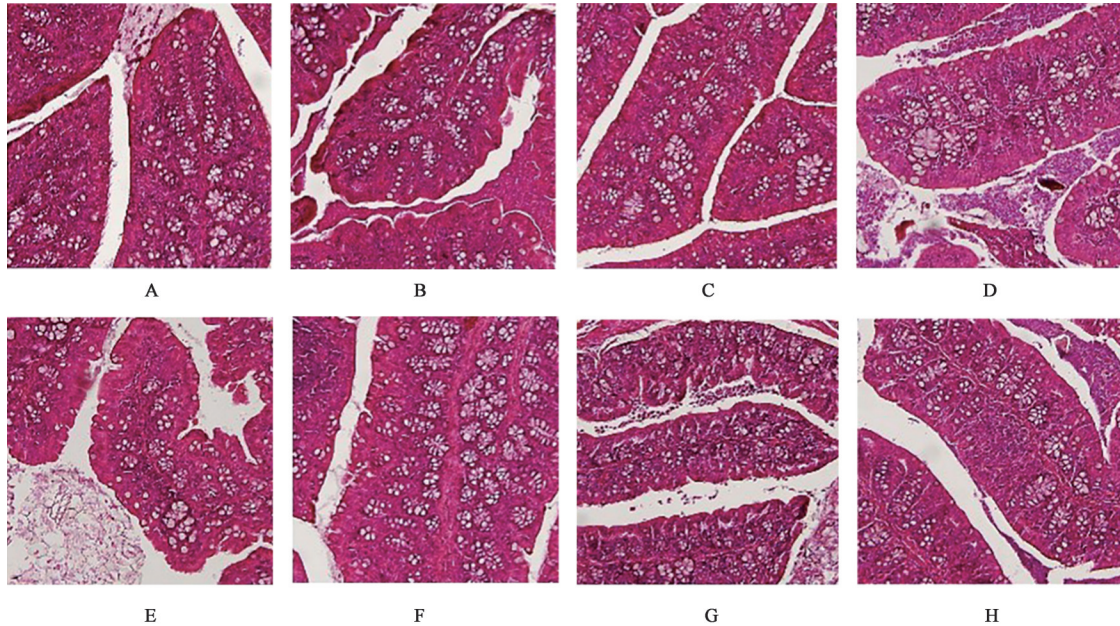
注:A.正常组;B.黄芩汤高剂量组;C.菌群干扰组;D.模型组;E.黄芩汤中剂量组;F.菌群干扰模型组;G.黄芩汤低剂量组;H.菌群干扰黄芩汤组

图3 结肠组织对比

Fig. 3 Comparison of colonic tissue

镜下观察病理切片,正常组结肠组织结构完整,黏膜纹理清楚,腺体排列整齐。模型组镜下出现畸变隐窝,并可见黏膜层变薄,杯状细胞减少,有炎症细胞浸润,组织整体结构混乱。与模型组比较,黄芩汤给药组炎症细胞浸润较少,肠上皮细胞排列较整齐,有少量脱落。菌群干扰组结肠组织镜下可见上皮绒毛顶端黏膜间隙扩大,细胞有明显脱落。菌群干扰模型组上皮细胞出现大量脱落,肌层明显变薄,有畸变隐窝,黏膜间隙扩大,且有大量炎

症细胞浸润。与菌群干扰模型组比较,菌群干扰黄芩汤组有肠上皮仅有少量细胞脱落。见图4。



注:A.正常组;B.黄芩汤高剂量组;C.黄芩汤低剂量组;D.菌群干扰模型组;E.模型组;F.黄芩汤中剂量组;G.菌群干扰组;H.菌群干扰黄芩汤组

图4 黄芩汤对UC小鼠结肠组织病理变化的影响(HE,×200)

Fig. 4 Effect of Huangqintang (HQT) on histopathologic changes of colon in UC mice (HE,×200)

3.3 对UC小鼠血清中IL-4、IL-6、IL-10、TNF-α含量的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清中的IL-4、IL-6、TNF-α含量明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),IL-10含量明显降低($P<0.05$)。与模型组比较,黄芩汤高、中、低剂量组小鼠血清中的IL-4、IL-6、TNF-α

含量明显下降($P<0.05$, $P<0.01$),IL-10含量上升($P<0.05$, $P<0.01$)。菌群干扰模型小鼠经黄芩汤干预后,与菌群干扰模型组比较,IL-4、IL-6、TNF-α含量降低,以IL-6最为显著($P<0.01$),IL-10含量显著升高($P<0.01$)。见表2。

表2 黄芩汤对UC小鼠血清炎症因子含量的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

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

mg·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-4	IL-6	IL-10	TNF-α
正常组		17.83±1.01	9.82±0.24	123.52±20.00	29.24±2.06
模型组		44.35±11.34 ¹⁾	15.74±1.54 ²⁾	72.14±20.33 ¹⁾	60.13±14.49 ¹⁾
黄芩汤高剂量组	20	21.55±1.08 ⁴⁾	11.76±0.28 ⁴⁾	147.56±40.04 ³⁾	45.49±4.24 ⁴⁾
黄芩汤中剂量组	10	21.20±1.54 ³⁾	9.01±0.38 ⁴⁾	112.99±11.01 ⁴⁾	57.99±11.70
黄芩汤低剂量组	5	17.37±3.82	9.92±0.18 ⁴⁾	125.63±2.03 ⁴⁾	36.36±3.99 ³⁾
菌群干扰组		21.44±3.10	6.37±1.11 ¹⁾	148.78±11.36 ²⁾	37.14±6.61 ¹⁾
菌群干扰模型组		41.04±5.76	10.98±1.45 ³⁾	70.24±5.15	47.91±1.35
菌群干扰黄芩汤组	20	38.44±2.82	8.27±0.09 ⁶⁾	161.45±27.80 ⁶⁾	41.07±8.76

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⁾ $P<0.01$;与菌群干扰模型组比较⁵⁾ $P<0.05$,⁶⁾ $P<0.01$ (表3和表4同)

3.4 对UC小鼠结肠组织中Claudin1、MUC1、Occludin、ZO-1 mRNA表达的影响 与正常组比较,模型组中Claudin1、MUC1、Occludin、ZO-1 mRNA表达水平显著下调($P<0.01$)。与模型组比较,黄芩汤高剂量组Claudin1、MUC1的mRNA表达水平显著上升($P<0.01$),ZO-1明显上升($P<0.05$),中剂量

组能显著上调Occludin、ZO-1 mRNA的表达水平($P<0.01$),低剂量组小鼠结肠中Occludin、ZO-1 mRNA表达水平显著升高($P<0.01$)。与菌群干扰模型组比较,菌群干扰黄芩汤组小鼠的Claudin1、MUC1、Occludin、ZO-1 mRNA表达水平均显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表3。

表3 黄芩汤对UC小鼠结肠组织肠黏膜屏障蛋白mRNA表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of HQT on expression level of intestinal mucosal barrier protein mRNA in colon tissue of UC mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Claudin1	MUC1	Occludin	ZO-1
正常组		1.01±0.21	1.00±0.11	1.01±0.20	1.01±0.20
模型组		0.76±0.07 ²⁾	0.70±0.06 ²⁾	0.41±0.02 ²⁾	0.51±0.05 ²⁾
黄芩汤高剂量组	20	2.90±0.06 ⁴⁾	2.00±0.07 ⁴⁾	1.07±0.29	1.07±0.29 ³⁾
黄芩汤中剂量组	10	1.58±0.38	0.97±0.18	1.90±0.12 ⁴⁾	1.90±0.12 ⁴⁾
黄芩汤低剂量组	5	0.60±0.08	0.56±0.04	1.56±0.05 ⁴⁾	1.56±0.05 ⁴⁾
菌群干扰组		2.24±0.27 ²⁾	2.15±0.31 ²⁾	1.74±0.07 ²⁾	1.74±0.07 ²⁾
菌群干扰模型组		0.50±0.09 ³⁾	0.44±0.00 ⁴⁾	1.06±0.03 ⁴⁾	1.06±0.03 ⁴⁾
菌群干扰黄芩汤组	20	2.09±0.20 ⁶⁾	2.43±0.01 ⁶⁾	3.01±0.19 ⁶⁾	3.01±0.19 ⁶⁾

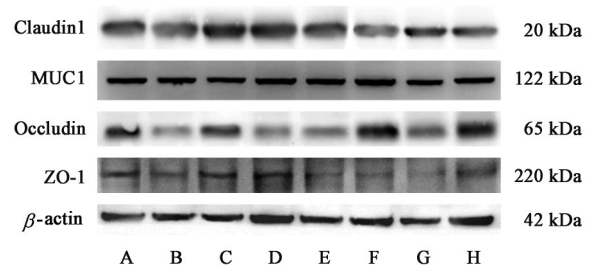
3.5 对UC小鼠结肠组织中Claudin1、MUC1、Occludin、ZO-1蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组Claudin1、Occludin、ZO-1蛋白表达量明显降低($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,黄芩汤高、中、低剂量干预后,Claudin1、MUC1、Occludin、ZO-1蛋白表达量均有所升高,其中黄芩汤高剂量组Claudin1、Occludin蛋白表达明显升高($P<0.05, P<0.01$),黄芩汤中剂量组ZO-1蛋白含量显著上升($P<0.01$)。与正常组比较,菌群干扰组小鼠结肠中MUC1、Occludin蛋白表达量明显增多($P<0.05$);与菌群干扰模型组比较,菌群干扰黄芩汤组中MUC1、Occludin、ZO-1蛋白的表达量明显增多($P<0.05, P<0.01$)。见图5、表4。

3.6 肠道菌群物种多样性 图中为Rank-Abundance曲线,用以体现物种丰度和均匀度。可见菌群干扰组小鼠的肠道菌群物种丰度最低,这是由于给予的抗生素干扰并消耗了肠道菌群。菌群干扰给药组横坐标的范围最大,表明黄芩汤干预后被消耗的肠道菌群得到了恢复,物种丰度增加。可以看出,菌群干扰组和其他各组共有的OUT数目最少。 α 多样性分析结果表明菌群干扰组肠道菌的物

表4 黄芩汤对UC小鼠结肠组织肠黏膜屏障蛋白表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of HQT on expression level of intestinal mucosal barrier protein in colon tissue of UC mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Claudin1/ β -actin	MUC1/ β -actin	Occludin/ β -actin	ZO-1/ β -actin
正常组		1.02±0.03	1.02±0.04	1.04±0.04	1.03±0.04
模型组		0.81±0.02 ¹⁾	0.91±0.01	0.73±0.01 ¹⁾	0.82±0.02 ¹⁾
黄芩汤高剂量组	20	1.15±0.04 ⁴⁾	1.07±0.01	0.95±0.04 ³⁾	1.12±0.03
黄芩汤中剂量组	10	0.92±0.03	1.16±0.03	0.88±0.04	1.27±0.03 ⁴⁾
黄芩汤低剂量组	5	1.00±0.01 ³⁾	1.03±0.02	0.93±0.01	0.96±0.01
菌群干扰组		1.07±0.03	1.41±0.04 ¹⁾	1.20±0.03 ¹⁾	1.14±0.04
菌群干扰模型组		0.77±0.02	0.77±0.03	0.84±0.03	0.71±0.01
菌群干扰黄芩汤组	20	0.71±0.05	1.21±0.03 ⁵⁾	1.00±0.03 ⁵⁾	0.91±0.01 ⁶⁾



注:A.正常组;B.模型组;C.黄芩汤高剂量组;D.黄芩汤中剂量组;E.黄芩汤低剂量组;F.菌群干扰组;G.菌群干扰模型组;H.菌群干扰给药组

图5 各组结肠组织肠黏膜屏障蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of intestinal mucosal barrier protein expression in colon tissue of each groups

种多样性最低,其余各组别无明显差距。Shannon指数可以体现样本中微生物的多样性,并反映测序数据量的合理性,中各组稀释曲线趋于平缓,表明样本量足以体现样本的微生物多样性信息。菌群干扰组曲线位于最低处,说明这组样本中物种数量最少,菌群干扰组小鼠的肠道菌群物种数量消耗显著。见增强出版附加材料。

3.7 肠道菌群物种组成分析 在门水平上,除菌群干扰组的各组优势菌门为厚壁菌门(Firmicutes)和

拟杆菌门(Bacteroidetes), 共占80%以上。给予抗生素干扰后, 菌群构成变得单一, 仅变形菌门(Proteobacteria)为优势菌门。在属水平上, 菌群干扰组中肠杆菌属(Enterobacteriaceae)、乳酸杆菌属(Lactobacillus)、大肠埃希菌志贺菌属(Escherichia-Shigella)、克雷白氏杆菌属(Klebsiella)等数量有明显变化。见增强出版附加材料。

3.8 肠道菌群物种组成比较 在门水平和属水平上, 菌群干扰组的构成与其他各组相比均有明显不同。见增强出版附加材料。

3.9 肠道菌群差异物种检验 两组间进行比较, 在门水平上, 与正常组比较, 模型组中厚壁菌门、变形菌门增多, 但差异不显著, 拟杆菌门和柔壁菌门(Tenericutes)明显减少($P<0.05$); 菌群干扰组中变形菌门显著增多($P<0.01$), 厚壁菌门、拟杆菌门显著减少($P<0.01$)。菌群干扰模型组相比于模型组, 肠道微生物群中拟杆菌门增多($P<0.05$), 变形菌门、厚壁菌门明显减少($P<0.05, P<0.01$)。与菌群干扰模型组比较, 菌群干扰给药组厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门减少, 其中变形菌门差异明显($P<0.05$)。多组间进行比较发现, 黄芩汤高、中、低3个剂量组在拟杆菌门和柔壁菌门明显增多($P<0.05, P<0.01$), 在厚壁菌门明显减少($P<0.05$)。见增强出版附加材料。在多组间进行差异物种检验, 结果见增强出版附加材料。属水平上, 比较正常组、模型组、模型组造模第4天的鼠粪, 可以看出在造模过程中, *norank f Bacteroidales S24-7 group*、*norank f Lachnospiraceae*、*Escherichia-Shigella*、*Ruminococcaceae UCG-014*、*Erysipelatoclostridium* 菌属产生了差异($P<0.05, P<0.01$); 比较菌群干扰组、菌群干扰模型组与菌群干扰模型组第4天的粪便样本, 发现经抗生素干扰后, 在造模过程中, *Bacteroides*、*norank f Bacteroidales S24-7 group*、*unclassified f Enterobacteriaceae*、*Klebsiella*、*Escherichia-Shigella*、*Lachnospiraceae NK4A136 group*、*Parasutterella*、*Erysipelatoclostridium*、*Morganella*、*Rikenellaceae RC9 gut group*、*Akkermansia*、*Blautia*、*Paraprevotella* 菌属有明显区别($P<0.05, P<0.01$); 黄芩汤3个剂量组间, *norank f Bacteroidales S24-7 group*、*Helicobacter*、*unclassified f Lachnospiraceae* 明显差异($P<0.05$), 并且乳酸菌属(*Lactobacillus*)、大肠埃希菌志贺属(*Escherichia-Shigella*)、螺杆菌(*Helicobacter*)、毛螺菌属(*Lachnospiraceae NK4A136 group*)在小鼠肠道中的

丰度与黄芩汤的剂量呈正比。

4 讨论

UC是一种慢性疾病, 以先天和获得性免疫系统失调为特征。在UC的发展过程中, 免疫细胞受到刺激, 释放大量的促炎细胞因子, 细胞因子反过来又进一步触发免疫反应, 诱导上皮细胞凋亡, 从而损害肠上皮细胞紧密连接, 破坏上皮屏障^[11]。目前研究已经证实, UC的发病是Th2细胞分化增加的异常免疫反应, 其所分泌的IL-4、IL-6可以促进多种介导炎症反应的黏附分子表达^[12], 诱导STAT3磷酸化^[13], 从而加重炎症反应。TNF- α 可激活NF- κ B、MAPK等炎症通路, 抗TNF- α 生物制剂是治疗UC的药物之一^[14]。IL-10则是一种抗炎细胞因子, 可以增强Treg细胞的分化, 在多种免疫反应中发挥反馈调节的作用^[15]。本研究中, DSS诱导的UC小鼠血清中IL-4、IL-6、TNF- α 含量上升, IL-10含量下降, 表明小鼠体内出现炎症反应; 经黄芩汤给药干预后, 情况均有好转, 说明黄芩汤对DSS诱导的小鼠UC有确切治疗作用。

人体肠道中每平方厘米分布着 $1\times 10^{11}\sim 1\times 10^{12}$ 个微生物, 这些微生物群在维持胃肠道黏膜完整、免疫系统稳态和调节宿主能量代谢方面起着至关重要的作用, 微生物群的失调可导致病理异常和炎症^[16]。机体抵御入侵肠道的病原体的第一道防线是肠黏膜屏障, 由紧密连接的上皮细胞和其产生的黏液层组成。紧密连接功能依赖紧密连接蛋白实现, 包括Claudins、Occludins、ZO等^[17]。紧密连接蛋白通过相互连接, 实现水、脂质、离子等物质的运输功能。肠道菌分泌的短链脂肪酸(SCFA)和黏蛋白等共同构成了肠上皮细胞表面的黏液层, 其中内层较为牢固, 由MUC形成, 抵抗密集的微生物定植; 外层比较松散, 可与肠道菌群共生。肠道微生物利用黏液作为营养物质, 并在病原体入侵期间降解黏液, 因此肠道微生物群对黏蛋白降解的增加可视作IBD的标志^[18]。本实验中, 经DSS诱导的UC小鼠结肠中Occludin、Claudin1、ZO-1 mRNA及蛋白表达均显著下降, 给药黄芩汤后, 上述蛋白表达相比模型组显著上调, 表明黄芩汤可以修复受损的肠黏膜屏障。

抗生素的使用对于传染病的治疗有着巨大意义, 然而同样会影响肠道内有益微生物的生长, 导致微生物群的多样性下降, 破坏了肠道内微生物的稳态, 并削弱了对外来病原菌的定殖抵抗力^[19]。采用高通量测序对比各组肠道内菌群, 可以看出, 给

予抗生素后,小鼠结肠内菌群不论是物种多样性还是物种丰度均有明显下降,物种组成与整体结构与其他各组相比有显著差异。与正常组相比,菌群干扰组小鼠的肠道中革兰氏阳性菌如毛螺菌属(*norank f Lachnospiraceae*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)明显减少,革兰氏阴性菌(*Parasutterella*)、克雷白氏杆菌(*Klebsiella*)、肠杆菌属(*unclassified f Enterobacteriaceae*)、摩根氏菌属(*Morganella*)则明显增多。革兰氏阳性菌可以促进肠上皮细胞更新^[20],因此实验中小鼠肠黏膜屏障受损可能是由于菌群中革兰氏阳性菌减少^[21]。HE染色结果亦显示,菌群干扰模型组相比于模型组,上皮脱落的情况更加严重,推测与菌群干扰模型组小鼠肠道中嗜粘蛋白-艾克曼菌(*Akkermansia*)显著增多有关。有研究显示,艾克曼菌定植于肠道黏膜层,与炎症肠病、高血压、糖尿病等疾病呈负相关^[23],但宿主产生的黏蛋白是其唯一的碳源^[22]。本实验中,小鼠肠道内增多的艾克曼菌消耗黏蛋白MUC1,导致黏液层变薄,使得黏膜屏障通透性增加,病原体进一步入侵^[24]。而使用黄芩汤干预后,肠黏膜屏障标志性蛋白与抑炎因子表达上调,促炎因子表达显著下调,并显著增多真杆菌属(*Eubacterium fissicatena group*),降低帕拉普氏菌属(*Paraprevotella*),表明肠道菌群受到干扰时黄芩汤依然具有抗炎和修复黏膜屏障的功效。

与正常组比较,模型组中大肠埃希菌志贺属(*Escherichia-Shigella*)明显增多,拟杆菌属(*Bacteroidales S24-7 group*)、理研菌属(*Alistipes*)、普雷沃氏菌属(*Prevotellaceae UCG-001*)、*Odoribacter*、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)显著减少。拟杆菌门是肠道的优势菌群,能够预防肠道炎症,维持肠道稳态等,对维持机体健康具有重要意义^[25]。有研究表明*Bacteroidales S24-7 group*能缓解诱导的小鼠结肠炎^[26]。*Odoribacter*代谢后产生丁酸,可作为肠道上皮细胞的能量来源,并具有抗炎作用^[27]。本实验证明黄芩汤能显著改善DSS造模导致的菌群失调,通过增加有益菌丰度,降低有害菌丰度,发挥治疗作用。

大肠埃希菌是一种典型的致病菌,本实验中,DSS造模后大肠埃希菌志贺属(*Escherichia-Shigella*)显著增多,经黄芩汤不同剂量组干预后均有显著降低。表明DSS诱导的结肠炎与大肠埃希菌有密切关系,而黄芩汤能通过降低大肠埃希菌志贺属的丰度发挥抗炎作用。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] GAJENDRAN M, LOGANATHAN P, JIMENEZ G, et al. A comprehensive review and update on ulcerative colitis[J]. Dis Mon, 2019, 65(12):100851.
- [2] VAN DER POST S, JABBAR K S, BIRCHENOUGH G, et al. Structural weakening of the colonic mucus barrier is an early event in ulcerative colitis pathogenesis[J]. Gut, 2019, 68(12):2142-2151.
- [3] 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, 24:600-610.
- [4] HAIFER C, PARAMSOTHY S, KAAKOUSH N O, et al. Lyophilised oral faecal microbiota transplantation for ulcerative colitis (LOTUS): A randomised, double-blind, placebo-controlled trial [J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2022, 7(2):141-151.
- [5] CAPALDO C T, POWELL D N, KALMAN D. Layered defense: How mucus and tight junctions seal the intestinal barrier[J]. J Mol Med (Berl), 2017, 95(9):927-934.
- [6] HOU J, HU M, ZHANG L, et al. Dietary taxifolin protects against dextran sulfate sodium-induced colitis via NF- κ B signaling, enhancing intestinal barrier and modulating Gut Microbiota[J]. Front Immunol, 2021, 11:631809.
- [7] 马旭冉,王彦礼,邹迪新,等. 黄芩汤调控Nrf2通路对溃疡性结肠炎大鼠氧化应激作用的影响[J]. 药学报, 2019, 54(4):653-659.
- [8] 王怡薇,张会会,王彦礼,等. 黄芩汤对溃疡性结肠炎大鼠NF- κ B p65调控作用研究[J]. 药学报, 2015, 50(1):21-27.
- [9] 马旭冉,王彦礼,邹迪新,等. 3种止泻方对大鼠溃疡性结肠炎的炎性细胞因子与肠道菌群影响的对比研究[J]. 药学报, 2019, 54(7):1241-1250.
- [10] 徐航宇,王彦礼,王敦方,等. 高通量测序技术研究黄芩汤对溃疡性结肠炎大鼠肠道菌群的影响[J]. 药学报, 2017, 52(11):1673-1682.
- [11] 尚威,吴华,陈艳,等. 蒙花苷对溃疡性结肠炎小鼠肠黏膜屏障的影响[J]. 免疫学杂志, 2022, 38(5):424-431.
- [12] DELGADO-RAMIREZ Y, COLLY V, GONZALEZ G V, et al. Signal transducer and activator of transcription 6 as a target in colon cancer therapy[J]. Oncol Lett, 2020, 20(1):455-464.

- [13] BAYIK D, LATHIA J D. Cancer stem cell-immune cell crosstalk in tumour progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(8):526-536.
- [14] LIN S Y, WANG Y Y, CHANG C Y, et al. TNF- α receptor inhibitor alleviates metabolic and inflammatory changes in a rat model of ischemic stroke [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(6):851-851.
- [15] MAO X C, YANG C C, YANG Y F, et al. Peripheral cytokine levels as novel predictors of survival in cancer patients treated with immune checkpoint inhibitors: A systematic review and meta-analysis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13:884592.
- [16] ZEGARRA RUIZ D F, KIM D V, NORWOOD K, et al. Microbiota manipulation to increase macrophage IL-10 improves colitis and limits colitis-associated colorectal cancer [J]. *Gut Microbes*, 2022, 14(1):2119054.
- [17] DONG L, XIE J, WANG Y, et al. Mannose ameliorates experimental colitis by protecting intestinal barrier integrity [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1):4804.
- [18] MARTENS E C, NEUMANN M, DESAI M S. Interactions of commensal and pathogenic microorganisms with the intestinal mucosal barrier [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2018, 16(8):457-470.
- [19] STRATI F, PUJOLASSOS M, BURRELLO C, et al. Antibiotic-associated dysbiosis affects the ability of the gut microbiota to control intestinal inflammation upon fecal microbiota transplantation in experimental colitis models [J]. *Microbiome*, 2021, 9(1):39.
- [20] DERRIEN M, VAN BAARLEN P, HOOIVELD G, et al. Modulation of mucosal immune response, tolerance, and proliferation in mice colonized by the mucin-degrader *Akkermansia muciniphila* [J]. *Front Microbiol*, 2011, 2:166.
- [21] GANESH B P, KLOPFLEISCH R, LOH G, et al. Commensal *Akkermansia muciniphila* exacerbates gut inflammation in *Salmonella Typhimurium*-infected gnotobiotic mice [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9):e74963.
- [22] TALEB V, LIAO Q, NARIMATSU Y, et al. Structural and mechanistic insights into the cleavage of clustered O-glycan patches-containing glycoproteins by mucinases of the human gut [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1):4324.
- [23] DEPOMMIER C, EVERARD A, DRUART C, et al. Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: A proof-of-concept exploratory study [J]. *Nat Med*, 2019, 25(7):1096-1103.
- [24] SHIMBORI C, DE PALMA G, BAERG L, et al. Gut bacteria interact directly with colonic mast cells in a humanized mouse model of IBS [J]. *Gut Microbes*, 2022, 14(1):2105095.
- [25] BROWN E M, KE X, HITCHCOCK D, et al. Bacteroides-derived sphingolipids are critical for maintaining intestinal homeostasis and symbiosis [J]. *Cell Host Microbe*, 2019, 25(5):668-680.
- [26] ROOKS M G, VEIGA P, WARDWELL-SCOTT L H, et al. Gut microbiome composition and function in experimental colitis during active disease and treatment-induced remission [J]. *ISME J*, 2014, 8(7):1403-1417.
- [27] LIMA SF, GOGOKHIA L, VILADOMIU M, et al. Transferable immunoglobulin a-coated odoribacter splanchnicus in responders to fecal microbiota transplantation for ulcerative colitis limits colonic inflammation [J]. *Gastroenterology*, 2022, 162(1):166-178.

[责任编辑 周冰冰]