

化瘀解毒方改善子宫内位症小鼠肠道菌群及粪便代谢组

赵倩倩¹, 倪喆鑫², 毕艳丽¹, 孙帅², 程雯², 俞超芹^{1,2*}

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 海军军医大学第一附属医院(上海长海医院), 上海 200433)

[摘要] 目的:探讨化瘀解毒方(HYJDP)对子宫内位症模型小鼠肠道菌群、粪便代谢物和异位病灶的影响。方法:将正常雌性C57BL/6J小鼠分为正常组(CO),子宫内位症组(EM),化瘀解毒方组(CM),CO和EM组予生理盐水灌胃,CM组予HYJDP汤药灌胃。采用非靶向代谢组学检测小鼠粪便上清中代谢物,运用接受者操作特性曲线(ROC)分析筛选重要差异代谢物;采用16S rRNA高通量测序方法检测小鼠肠道菌群结构,并用Spearman相关系数表示差异代谢物与肠道菌群之间关联程度;酶联免疫吸附测定(ELISA)检测小鼠肠壁组织、血清及腹腔液中脂多糖(LPS)含量;运用免疫组化检测异位病灶中波形蛋白(Vimentin)和钙黏蛋白(E-cadherin)表达情况。结果:HYJDP能够恢复子宫内位症小鼠肠道菌群紊乱代谢物水平,以homoveratric acid, melilotoside C和physapubescin 3种代谢物水平恢复为特征, homoveratric acid, melilotoside C和physapubescin EM分别与CO,CM比较时变量权重值(VIP)值均超过2且ROC分析中AUC值均>0.9。与EM组比较, HYJDP能够恢复子宫内位症小鼠肠道菌群中 *Lachnospiraceae_NK4A136_group*, *Lactobacillus*, *Blautia*等物种丰度($P<0.05$)。EM组腹腔液上清LPS水平明显高于CO组($P<0.05$),并明显高于CM组($P<0.05$)。子宫内位症灶Vimentin和E-cadherin蛋白表达显著降低($P<0.05$)。结论:HYJDP能够改善子宫内位症小鼠肠道内环境,降低体内LPS水平,减轻异位灶纤维化,是治疗子宫内位症的有效药物。

[关键词] 子宫内位症; 化瘀解毒方; 肠道菌群; 代谢组学; 脂多糖

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)09-0202-13

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210501

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210226.1612.005.html>

[网络出版日期] 2021-2-26 17:03

Huayu Jiedu Prescription Alleviates Gut Microbiota and Fecal Metabolites in Mice with Endometriosis

ZHAO Qian-qian¹, NI Zhe-xin², BI Yan-li¹, SUN Shuai², CHENG Wen², YU Chao-qin^{1,2*}

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

2. First Affiliated Hospital of Naval Military Medical University (Changhai Hospital of Shanghai), Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Huayu Jiedu prescription (HYJDP) on gut microbiota and fecal metabolites in mice with endometriosis. **Method:** Normal female C57BL/6J mice were divided into normal control group (CO), endometriosis group (EM) and Chinese medicine Huayu Jiedu decoction group (CM). CO and EM groups received normal saline and CM group received HYJDP by intragastric administration. Untargeted metabolomics method was used to detect metabolites in fecal supernatant of mice, and receiver operating characteristic (ROC) analysis was used to screen the differential metabolites, 16S rRNA high-throughput sequencing was used to detect the gut microbiota, and Spearman correlation

[收稿日期] 20201117(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81703874);上海市中医药三年行动计划项目[ZY(2018-2020)-FWTX-1107]

[第一作者] 赵倩倩,在读硕士,从事子宫内位症机制研究, Tel:021-81867103, E-mail: 15358865713@163.com

[通信作者] *俞超芹,教授,主任医师,博士生导师,从事中西医结合子宫内位症基础与临床研究, Tel:021-81867103, E-mail: chqyu81@163.com

coefficient was used to represent the degree of correlation between differential metabolites and intestinal flora. Lipopolysaccharides (LPSs) in intestinal wall tissue, serum and peritoneal lavage fluid were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of Vimentin and E-cadherin in ectopic lesions was detected by immunohistochemistry. **Result:** HYJDP alleviated the disorders of fecal metabolites and gut microbiota in EMS mice, especially with the recovered levels of homoveratric acid, melilotoside C and physapubescin in fecal supernatant. In the comparison of these three factors between EM group and CO group as well as between EM group and CM group, the variable important in projection (VIP) value was both above 2, and AUC in ROC analysis was both >0.9. As compared with EM group, HYJDP restored the abundance of species such as *Lachnospiraceae_NK4A136_group*, *Lactobacillus* and *Blautia* ($P<0.05$). In addition, the level of LPS in peritoneal fluid supernatant of EM group was significantly higher than that of CO group ($P<0.05$) and CM group ($P<0.05$). The protein expression of vimentin and E-cadherin in endometriosis decreased significantly ($P<0.05$). **Conclusion:** HYJDP which can improve the intestinal environment and reduce the level of LPS in mice with endometriosis, is an effective drug for the treatment of endometriosis.

[Key words] endometriosis; Huayu Jiedu prescription (HYJDP); intestinal flora; metabolomics; lipopolysaccharide

子宫内膜异位症(内异症)影响着全球5%~10%育龄期妇女,是子宫内膜腺体和基质种植生长于子宫被覆内膜及子宫体以外的一种慢性雌激素依赖性疾病^[1]。由于发病原因尚未明确,目前的治疗方法仅限于对症治疗,无法针对病因的手术治疗^[2]。目前认为,子宫内膜异位症是一个多因素的疾病,是由多种遗传、激素、免疫和环境因素的复杂相互作用决定的^[3]。

肠道菌群现在被认为是决定宿主健康和赋予宿主扩展代谢能力的重要因素^[4]。事实上,消化道内的微生物不仅是食物消化所必需的,而且还参与了雌激素代谢^[5]、全身炎症^[6]和干细胞内稳态的调节等机体活动^[7]。微生物组和代谢组学技术的综合分析表明,肠道菌群失调与许多疾病中多种代谢物的失调直接相关^[8]。已有充分证据表明,肠道菌群失调及代谢表型改变与肥胖、糖尿病、动脉粥样硬化等多种疾病相关^[9]。在子宫内膜异位症与肠道菌群研究方面,近几年的动物实验研究发现,内异症小鼠出现了肠道菌群紊乱^[10];抗生素治疗及菌群移植,可改变肠道菌群,从而影响改变子宫内膜异位症小鼠疾病进展^[11]。

脂多糖(LPS)是绝大多数革兰氏阴性菌外膜的必需组成部分,而这些革兰氏阴性菌每一次进行分裂,就会合成和运输数百万的LPS分子^[12]。当细菌死亡溶解或者人为破坏后,大量LPS会被释放出来,与人体内各种细胞相互作用,引起机体一系列反应,如持续低度炎症^[13]。肠道菌群结构失调会影响肠道内环境,导致肠壁免疫功能失调、通透性改

变^[14],进而可能使得肠道内LPS渗透到腹腔内,引起腹腔内环境的改变。有研究认为内异症是一种炎症性疾病,其发生发展与人体盆腔内环境紊乱密不可分^[15]。LPS是一种经典促炎因子,主要通过作用于Toll样受体信号通路(Toll-like receptor signaling pathway)从而发挥作用,能够诱发机体产生多种炎症反应因子,从而导致盆腔炎症性环境的出现与维持^[16]。研究显示,内异症患者腹腔液中LPS的水平较健康女性显著升高^[17],而LPS能够促进内异症模型小鼠的病灶生长^[18]。提示LPS在内异症的发生发展中发挥着重要作用。

化瘀解毒方(HYJDP)是治疗子宫内膜异位症的一个中药复方,它的主要药物为大血藤、莪术、生蒲黄、制乳香,没药,淫羊藿。前期研究已证实该方具有很好的临床疗效^[19],但其作用机制尚不明确。网络药理学是近年来用于研究中药的有利工具,能够对疾病相关基因进行优先排序,预测中药化合物的靶向和药理作用,揭示“药物-基因-疾病”之间的关联,以高通量的方式从中药配方中筛选协同多化合物,并解释中药方剂的组合规律及网络调控效应^[20]。

本研究通过建立动物模型,探讨HYJDP对子宫内膜异位症小鼠粪便代谢物、肠道菌群以及体内LPS含量的影响,并利用网络药理学方法分析HYJDP对LPS相关通路的作用机制。

1 材料

1.1 动物及分组 从北京维通利华实验动物技术有限公司订购6周龄的健康雌性C57BL/6J小鼠,实

验动物合格证号 SCXK(京)2016-0006,饲养于长海医院中心实验室动物房,许可证号 SYXK(沪)2015-0017。每天早晨用阴道涂片监测动情周期,持续2周,并用动情周期正常的小鼠进行以下实验。采用随机数字表法分为正常组(CO),内异症模型组(EM)和化瘀解毒方治疗组(CM)。于上海长海医院动物中心 SPF 条件下饲养,一笼3只,每组各6只,12 h光照,12 h黑暗,每周更换1次垫料,24 h自由食用无菌营养颗粒饲料与无菌水。所有动物实验均符合动物伦理要求。

1.2 试剂 大血藤 30 g,莪术 9 g,生蒲黄 9 g,制乳香 9 g,没药 9 g,淫羊藿 18 g,所有饮片均来自海军军医大学第一附属医院(上海长海医院)中药房,经上海长海医院王忠壮教授鉴定为正品。将上述饮片常规煎煮,过滤,合并2次滤液,水浴旋蒸浓缩为每 mL 生药含量为 1.09 g 的药液,冷却后转入灭菌离心管,于 4 °C 存储备用。按《实验动物学》剂量换算表,将 60 kg 成人每日剂量(1.4 g·kg⁻¹·d⁻¹),以 0.002 6 为换算系数,换算成 20 g 小鼠每日的等效剂量为 10.92 g·kg⁻¹·d⁻¹。雌二醇(上海源叶生物科技有限公司,批号 R26A11Y122359);苏木素-伊红(HE)染色液(珠海贝索生物技术有限公司,批号 BA4025);封片剂(上海国药医药零售有限公司,批号 10004160);一抗波形蛋白(Vimentin),钙黏蛋白(E-cadherin),链霉亲和素-生物素复合物 SABC-POD[兔免疫球蛋白(Ig)G],内源性过氧化物酶阻断剂,EDTA 抗原修复液,抗体稀释液,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗液,DAB 显色试剂盒,Mayor'苏木素(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为 BA0135, BM4166, SA1020, AR1108, AR0023, AR1016, AR0030, AR1022, AR0038);LPS 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(美国 Cusabio 公司,批号 CSB-E13066m);DNA 抽提试剂盒(美国 BioTek 公司,批号 D4015-01);2% 琼脂糖凝胶(法国 Biowest 公司,批号 111860);FastPfu 聚合酶(北京全式金生物科技有限公司,批号 AP221-01);AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒(美国 Axygen 公司,批号 AP-GX-50);TruSeq™ DNA 样品盒(美国 Illumina 公司,批号 552);土壤基因组 DNA 提取试剂盒 FastDNASPIK Kit for Soil(美国 MP 公司,批号 116560200);高效液相色谱质谱甲醇 LCMS Methanol,高效液相色谱质谱氰化甲烷 LCMS Acetonitrile,高效液相色谱质谱甲酸 LCMS Formic Acid,高效液相色谱质谱水 LCMS WATER(美国

Fisher Chemical 公司,批号分别为 A456-4, A955-4, A117-50, W6-4);三氯甲烷(国药集团化学试剂有限公司,批号 100006818);2-Propanol(A451-4),固相萃取柱 Sep-Pak C₁₈ 1 cc Vac Cartridge, 100 mg Sorbent(美国 Waters 公司,批号均为 WAT023590)。

1.3 仪器 MiFly-6 型小型离心机(合肥艾本森科学仪器有限公司);Centrifuge 5424R 型冷冻离心机,5430 R 型高速台式冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);NanoDrop2000 型超微量分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);DYY-6C 型电泳仪(北京市六一仪器厂);ABI GeneAmp®9700 型 PCR 仪(美国 ABI 公司);MISEQ 型测序仪,HiSeq 型测序仪(美国 Illumina 公司);Elx800 型酶标仪(美国 BioTek 公司);TBS380 型微型荧光计(美国 TurnerBioSystems 公司);Covaris M220 型超声破碎仪(美国 Gene Company Limited 公司);QL-901 型漩涡混合器(海门其林贝尔仪器制造有限公司);TL-48R 型粉碎研磨仪(上海万柏生物科技有限公司);NewClassic MF MS105DU 型电子天平(美国梅特勒-托利多公司);PESB-5200DTD 型超声波清洗机 300W-10(宁波新芝生物科技股份有限公司);QB-210 型试管垂直旋转摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);FastPrep-24TM5G 型高通量组织破碎仪[MPBiomedicals(上海)公司];TMR 型恒温混匀仪(合肥艾本森科学仪器有限公司);LNG-T88 型台式快速离心浓缩干燥器(太仓市华美生化仪器厂);JXDC-20 型氮气吹扫仪(上海净信实业发展有限公司);ACQUITY UPLC 型 UPLC(美国 Waters 公司);ABSCIEX-Triple TOF 5600 型质谱仪(美国 AB SCIEX 公司)

2 方法

2.1 内异症模型构建与分组 内异症模型的制作在先前文献中有过报道^[21-22]。在造模开始的第 1, 4, 7 天给小鼠皮下注射雌激素溶液(20 mg·L⁻¹),第 8 天行子宫内膜碎片移植。将供体鼠乙醚麻醉并脱颈处死后,75%乙醇浸泡 3 min,解剖获得子宫。沿子宫纵轴剖开,剥离内膜层并剪碎为 1 mm×1 mm×1 mm 大小碎片后,用 20 mL 注射器吸取内膜碎片,按供体鼠与受体鼠以 1:2 的比例进行腹腔注射移植。移植后当天及造模的第 11, 14 天皮下注射雌激素溶液。小鼠自然生长 3 周后进行解剖与标本收集。内膜移植后 1 周开始,给予不同药物灌胃处理。CO 组予腹腔注射同等质量脂肪组织外,其余处理与 EM 组相同。CO 组和 EM 组予生理盐水灌胃,每

日给药1次,0.2 mL/只,连续3周。CM组予HYJDP汤药灌胃,每日给药1次,0.2 mL/只,连续3周。

2.2 ELISA检测小鼠血清、腹腔灌洗液及肠壁组织中LPS含量 小鼠乙醚麻醉后,予眼眶取血,以 $1\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ (离心半径11 cm)离心10 min,留取上层血清,置于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 保存。取血后予脱颈处死,75%乙醇浸泡3 min。用5 mL注射器吸取无菌生理盐水2 mL行腹腔注射。轻柔小鼠腹部1 min。剥除小鼠腹部局部皮毛,露出腹壁后剪开一小口,用注射器吸取腹腔灌洗液1.5 mL/只,于 $4\ ^\circ\text{C}$ 条件下, $1\ 300\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心6 min。去沉淀留取上清,置于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 保存。暴露腹腔,剪取小鼠相同部位1 cm长小肠段组织,沿纵轴剖开后,在冰冷的生理盐水中漂洗,除去食物参杂、血液,滤纸拭干,称取组织块。用移液管量取0.86%冷生理盐水,生理盐水的体积总量应该是组织块体积的9倍。冰上操作,用眼科小剪尽快剪碎组织块。用组织捣碎机1万~1.5万 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 上下研磨制成10%组织匀浆。将制备好的10%匀浆用离心机 $4\ ^\circ\text{C}$, $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,将离心好的匀浆留上清置于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 保存。根据ELISA说明书对小鼠血清、腹腔灌洗液离心后上清及肠壁组织匀浆上清进行LPS浓度检测。

2.3 免疫组化检测 Vimentin 和 E-cadherin 的表达

收集小鼠腹腔内异病灶组织,4%甲醛固定,石蜡包埋后切片,常规脱蜡和水化,3% H_2O_2 去离子水室温孵育5~10 min,以消除内源性过氧化物酶活性。PBS冲洗,每次5 min,冲洗3次。热修复后5%BSA封闭液 $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育30 min,甩干。滴加 Vimentin 或 E-cadherin 抗体, $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育2 h。PBS冲洗,每次5 min,洗3次。滴加生物素标记山羊抗兔 IgG, $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育30 min。PBS冲洗,每次5 min,冲洗3次。滴加链霉亲和素-生物素复合物 SABC, $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育30 min。PBS冲洗,每次5 min,冲洗3次。镜下控制反应时间,DAB显色,自来水充分冲洗。苏木素复染后,脱水,透明,封片后镜下观察拍照,使用 ImageJ 1.48 软件进行分光度统计。

2.4 粪便上清液质联用(LC-MS)检测 获取小鼠盲肠段粪便,置于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 保存。每份精确称量50 mg,并加入提取液(甲醇-水4:1)400 μL ,于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 低温下用高通量组织破碎仪破碎(50 Hz,6 min)。涡旋(30 s)混匀后,冰上超声萃取30 min($5\ ^\circ\text{C}$,40 kHz)。将样品于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 静置30 min后,在13 000 $\times\text{g}$, $4\ ^\circ\text{C}$ 条件下离心15 min。取上清液转移至LC-MS进样小瓶上机分析^[23]。将质谱信号原始

数据导入代谢组学处理软件 Progenesis QI 进行基线过滤、峰识别、积分、保留时间校正、峰对齐,最终得到一个保留时间、质荷比和峰面积的数据矩阵。仅保留任一组样品中非零值80%以上的变量;原始矩阵中极小值填补缺失值;总峰归一化,同时删除QC样本相对标准偏差(RSD) $\geq 30\%$ 的变量;将数据进行 \log_{10} 转化,得到最终用于后续分析的数据矩阵。用 Progenesis QI 进行搜库鉴定,将质谱信息与代谢数据库(<http://www.hmdb.ca/>, <https://metlin.scripps.edu/>)进行匹配。

采用无监督的主成分分析方法(PCA)来观察各样品之间的总体分布和组间的离散程度,然后用有监督的(正交)偏小二乘法分析[(O)PLS-DA]来区分各组间代谢轮廓的总体差异,寻找组间的差异代谢物。(O)PLS-DA分析中,变量权重值(VIP) >1 的变量设为差异变量。为防止模型过拟合,200次置换检验的方法来考察模型的拟合效果。采用T检验(Student's test)结合多元分析OPLS-DA的方法,筛选出组间差异代谢物(同时满足VIP >1 , $P<0.05$)。运用接受者操作特性曲线(ROC)分析计算曲线下面积(AUC),判别代谢物对组间区分影响程度,以发掘比较关键的代谢物,设置AUC值 >0.5 的代谢物为潜在组间区分Marker。

2.5 16S rRNA 高通量菌群测序 粪便DNA提取,PCR扩增以及Illumina MiSeq测序过程在之前的研究中有过描述^[24]。利用Illumina公司的MiSeq PE300平台进行测序。选择Silva数据库,以70%的阈值进行比较,得到各样品在不同分类水平上的群落组成。用Mothur软件(v 1.30.1)对肠道菌群 α 多样性指数(sobs, ace, shannon, simpson)进行分析。 β 多样性由三维主坐标分析(PCoA)图反映,采用R语言进行PCoA统计分析和作图。统计分析方法采用ANOSIM分析来判断分组是否有意义。根据菌群在属水平上的相对丰度计算样本间Jensen-Shannon Distance距离,从而完成菌群分群分析。采用Wilcoxon rank-sum test检验和FDR多重检验校正,分析两组在门、属水平上的物种差异组成差异,用四分位中位数(IQR)表示各水平物种相对丰度。利用R(pheatmap)开展“粪便代谢物-肠道菌群”关联分析,并用皮尔森相关系数表示关联程度。相关性系数以热图的方式展现,通过颜色梯度来反应相关性大小。

2.6 中药网络药理学研究 利用中药系统药理学数据库和分析平台TCMSP(<http://lsp.nwu.edu.cn/>

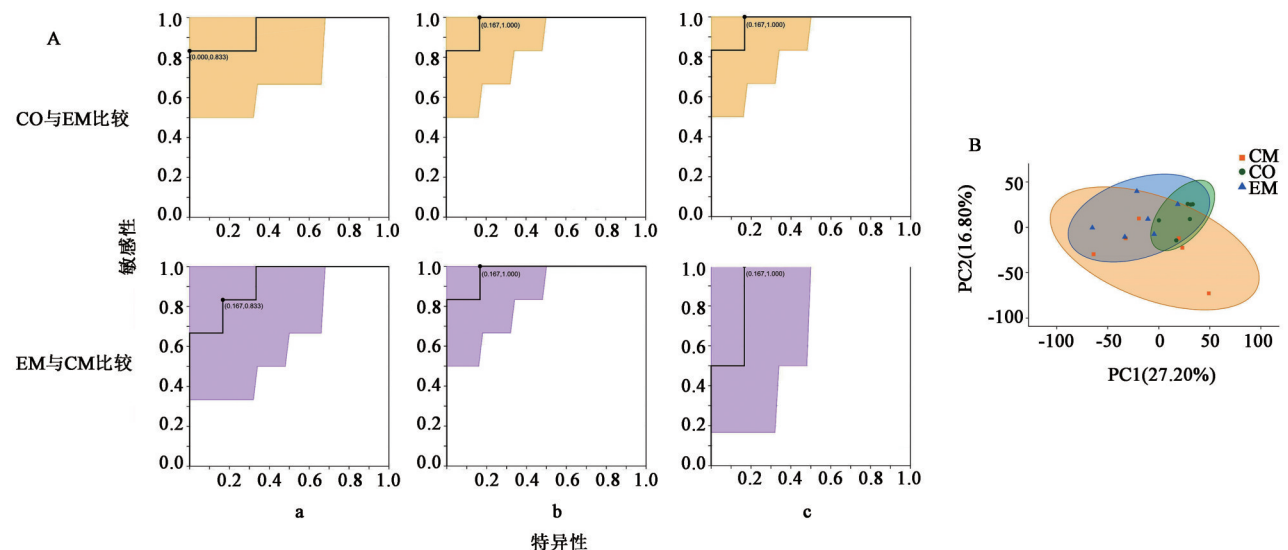
tcmsp.php)查找HYJDP所有中药化学成分,并获得每种化学成分吸收、分布、代谢、排泄的关键描述参数。设置同时满足口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 和类药指数(DL) ≥ 0.18 的化学成分作为有效活性成分。通过查询Drugbank数据库(<https://www.drugbank.ca/>)查询每种有效成分可能的作用靶点。利用Swiss-Prot/TrEMBL数据库(<https://www.uniprot.org/uniprot/>)将有效活性成分作用靶点信息转换成对应小鼠基因名。利用Cytoscape软件构建“中药-有效成分-作用靶点”网络,通过network analyzer插件分析网络特征情况。在DIVID数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)输入所有中药作小鼠基因靶点,获取Toll-like receptor signaling pathway相关靶点基因名,并在京都基因与基因组百科全书(KEGG)Mapper (https://www.kegg.jp/kegg/tool/map_pathway2.html)获取通路标记图。

2.7 统计学方法 多组间小鼠样本LPS数据采用one-way ANOVA检验,并进行多重比较,采用SPSS 21.0软件进行分析。EM和CM两组间免疫组化蛋白数据采用T检验,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用GraphPad Prism 7软件分析,所有统计检验均为双尾检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对内异症小鼠粪便代谢物的影响 对小鼠粪

便上清代谢物进行了非靶向代谢组学的检测,设置组间VIP > 1 , $P < 0.05$ 为代谢物作为差异代谢物。PCA分析发现,CO,EM和CM3组间样品分布存在差异(图1),从总体上反应3组样本之间的总体差异和组内样本之间的变异度大小。各个坐标点的距离代表了样本间聚集和离散程度,距离越近表明样本间相似性越高,距离越远表明样本间差异性越大。PC1和PC2分别表示第一和第二主成分贡献值。通过两两比较,挑选出3组间丰度前20的差异代谢物发现(表1),经中药治疗后,除代谢物1 α -hydroxy-25, 26, 27-trinorvitamin D₃ 24-carboxylic acid之外,其余19种代谢物水平向正常正常组水平改善。其中homoveratric acid, melilotoside C和physapubescin在CO与EM组间以及EM组与CM组间比较时,VIP值均 > 2 。进一步对这3种差异代谢物以CO组对比EM组和EM组对比CM组为背景作了ROC分析发现,AUC值均 > 0.9 (图1),AUC值越大,说明判别性能越好;95%置信区间(CI)表示基于非参数重抽样的方法计算的AUC的95%置信区间;曲线上的点是指基于ROC曲线确定的区分两组的最佳阈值。提示这3种代谢物可进一步被筛选作为HYJDP治疗内异症的潜在评价指标。



A. 主成分分析(PCA); a. homoveratric acid; b. melilotoside C; c. physapubescin; B. 代谢物ROC分析

图1 HYJDP对内异症小鼠粪便代谢物水平差异分析的影响

Fig. 1 Effect of HYJDP on differential analysis of fecal metabolite levels in endotrophic mice

3.2 对内异症小鼠肠道菌群结构的影响 对比CO,EM和CM3组小鼠肠道菌群结构发现,CM组运算分类单位(OTU)水平下等级丰度(Rank-

Abundance)曲线下下降趋势较缓于EM组,而略陡于CO组,曲线越平滑下降表明OTU多样性越高,而曲线快速陡然下降表明样本中的优势菌群所占比例

表 1 3 组间 20 种差异代谢物的丰度

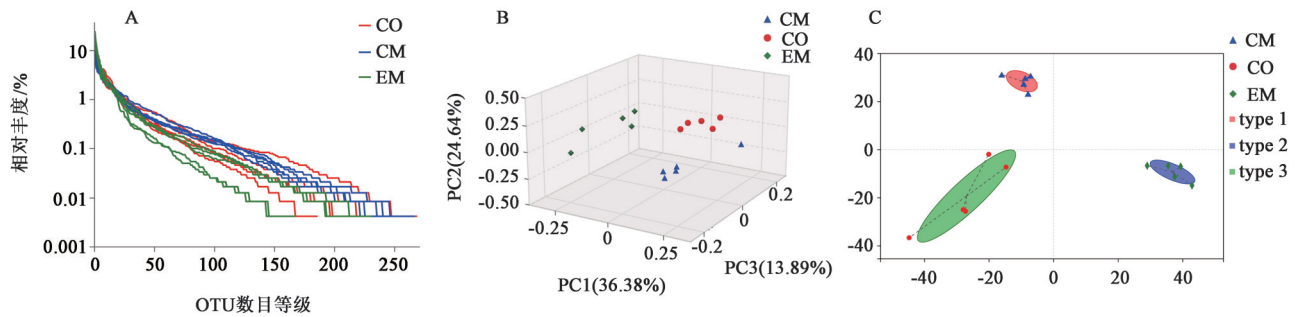
Table 1 Abundance of twenty differential metabolites in three groups

代谢物	m/z	模式	成分	t _R /min	组别 ($\bar{x} \pm s, n=6$)			CO/EM			EM/CM		
					CO	EM	CM	FC	P	VIP	FC	P	VIP
1-羟基-25,26,27-三维生素 D ₃ 24-羧酸 1 α -hydroxy-25,26,27-trinorvitamin D ₃ 24-carboxylic acid	389.27	pos	C24H36O4	5.84	4.85±0.05	4.68±0.13	4.47±0.12	1.04	0.016	1.13	1.05	0.018	1.65
4b-羟基司坦唑醇 4b-hydroxystanozolol	377.28	pos	C21H32N2O2	5.21	3.62±0.03	3.72±0.03	3.62±0.09	0.97	0.000	1.04	1.03	0.026	1.03
9R,10S-环氧硬脂酸 9R,10S-epoxy-stearic acid	299.26	pos	C18H34O3	7.81	4.44±0.09	4.70±0.14	4.46±0.21	0.95	0.005	1.47	1.05	0.045	1.57
刺甘草查尔酮 echinatin	271.10	pos	C16H14O4	3.90	2.12±0.06	2.26±0.09	2.03±0.20	0.94	0.012	1.03	1.11	0.030	1.54
十七烷酸 heptadecanoic acid	253.25	pos	C17H34O2	7.81	2.28±0.10	2.64±0.22	2.25±0.33	0.86	0.004	1.77	1.18	0.033	2.06
高瓜氨酸 homocitrulline	172.11	pos	C7H15N3O3	0.81	1.78±0.04	1.91±0.06	1.80±0.09	0.94	0.002	1.07	1.06	0.030	1.11
高藜芦酸 homoveratric acid	197.08	pos	C10H12O4	3.00	1.69±0.53	0.65±0.38	1.45±0.52	2.62	0.003	2.97	0.45	0.012	3.08
草木犀甙 A melilotoside A	555.40	pos	C35H58O7	8.30	3.20±0.13	3.41±0.19	2.99±0.33	0.94	0.046	1.17	1.14	0.021	2.20
草木犀甙 C melilotoside C	933.50	neg	C47H78O16	11.92	2.90±0.22	2.24±0.37	2.83±0.15	1.29	0.004	2.32	0.79	0.005	2.73
N1-乙酰亚精胺 N1-Acetyl spermidine	188.18	pos	C9H21N3O	0.58	2.41±0.11	2.62±0.18	2.39±0.14	0.92	0.037	1.21	1.09	0.036	1.66
N-甘油神经节苷脂 GM2 N-glycolylganglioside GM2	724.61	neg	C43H85NO8	11.63	2.55±0.28	2.97±0.27	2.59±0.17	0.86	0.026	1.67	1.15	0.016	2.03
酯类 nonate	171.10	pos	C9H16O4	3.56	2.38±0.10	2.56±0.11	2.32±0.21	0.93	0.015	1.19	1.10	0.035	1.63
油酰乙醇胺 oleoyl ethanolamide	326.30	pos	C20H39NO2	8.56	4.02±0.09	4.29±0.14	3.96±0.17	0.94	0.002	1.58	1.08	0.004	2.14
桃皮素 3'-糖苷 persicogenin 3'-glucoside	501.14	pos	C23H26O11	2.94	1.37±0.31	0.91±0.36	1.59±0.63	1.51	0.040	1.76	0.57	0.044	2.59
毛酸浆内酯 physapubescin	572.32	pos	C30H42O8	7.54	3.21±0.24	2.48±0.46	3.26±0.35	1.29	0.006	2.38	0.76	0.008	2.95
聚氧乙烯(600)蓖麻油酸酯 polyoxyethylene (600) mono-ricinoleate	341.30	pos	C21H40O3	7.81	2.98±0.11	3.24±0.16	2.92±0.25	0.92	0.009	1.46	1.11	0.025	1.87
postin	531.28	neg	C22H40N8O5	11.80	2.43±0.24	1.97±0.37	2.49±0.09	1.23	0.028	1.83	0.79	0.008	2.51
前列腺素 D ₂ prostaglandin D ₂	317.21	pos	C20H32O5	6.46	2.41±0.13	2.20±0.20	2.66±0.11	1.10	0.048	1.23	0.83	0.000	2.65
石榴酸 puniceic acid	279.23	pos	C18H30O2	5.81	2.89±0.10	3.17±0.15	2.82±0.16	0.91	0.004	1.56	1.13	0.003	2.21
缬氨酸 valinopine	248.11	pos	C10H17NO6	2.10	2.76±0.02	2.89±0.07	2.72±0.14	0.96	0.001	1.09	1.06	0.023	1.36

注: neg. 负离子扫描模式; pos. 正离子扫描方式; FC. 倍数变化。

很高,多样性较低,提示 EM 组物种多样性降低,经 HYJDP 治疗后有所恢复(图 2A)。在 beta 多样性方面,不同组样本点之间距离较远($P=0.001$),提示 3 组物种组成存在差异(图 2B)。在 alpha 多样性方面,EM 组 sobs, ace 和 shannon 指数低于其他两组,

simpson 指数显著高于其他 2 组,而 CO 与 CM 组之间无显著性差异(表 2),提示 EM 组小鼠肠道菌群多样性和丰富度降低,而 HYJDP 治疗后可恢复。进一步对 3 组样本进行 OTU 水平菌群分型分析后发现,3 组之间存在明显菌群分型差异(图 2C)。



A.Rank-Abundance 曲线;B.3D-PCA 分析;C.OTU 菌群分析

图2 HYJDP 对内异症小鼠肠道菌群结构分析的影响

Fig. 2 Effect of HYJDP on intestinal microflora structure analysis in endometriosis mice

表2 3组间 alpha 多样性指数比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Comparison of alpha diversity index among three groups ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	sobs	ace	shannon	simpson
CO	227.6±13.63	240.7±13.61	4.018±0.11	0.034±0.003
EM	198.4±13.58	211.8±12.85	3.544±0.14 ²⁾	0.062±0.009 ²⁾
CM	258.4±4.09 ¹⁾	273.1±3.79 ¹⁾	4.162±0.07 ¹⁾	0.035±0.004 ³⁾

注:与EM组比较¹⁾ $P<0.01$;与CO组比较²⁾ $P<0.05$;与EM组比较³⁾ $P<0.05$ 。

在门水平上,与CO组比较,EM组

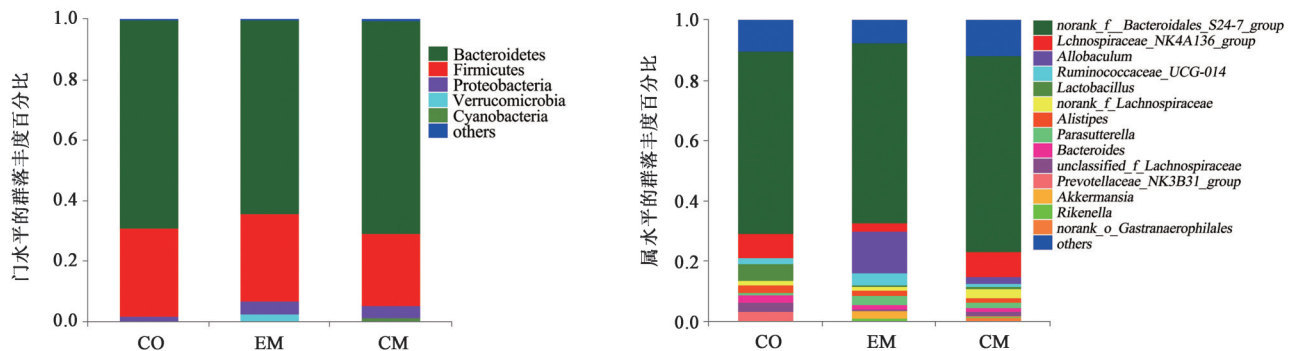


图3 3组门属水平群落丰度构成差异

Fig. 3 Difference of abundance composition at phylum and genus level among three groups

3.3 HYJDP 治疗前后肠道菌群与粪便代谢物关联分析 结合上文结果,进一步将 homoveratric acid, melilotoside C 和 physapubescin 3 种代谢物与 EM 及 CM 组属水平丰度前 20 的菌属进行了关联热图分析。X 轴和 Y 轴分别是代谢物和菌属,通过比较发现在 EM 组中,代谢物 Physapubescin 与 *Bacteroides* 丰度呈负相关 ($P<0.05$),而与 *norank_f_Bacteroidales_S24-7_group* 丰度呈正相关 ($P<0.05$)。代谢物 Melilotoside C 水平与 *Ruminococcaceae_UCG-014* 丰度呈正相关 ($P<0.05$),与 *norank_f_Lachnospiraceae_Ruminiclostridium_5* 丰度呈显著正相关 ($P<0.01$),而与 *Parasutterella* 丰度呈显著负

相关 ($P<0.01$) (图 4A)。在 CM 组中,代谢物 Homoveratric acid 水平与 *Lachnospiraceae_NK4A136_group*, *norank_f_Ruminococcaceae_Desulfovibrio*, *Unclassified_f_Lachnospiraceae_Ruminiclostridium_6* 丰度呈负相关 ($P<0.05$),与 *Ruminiclostridium_9* 丰度呈显著负相关 ($P<0.01$)。代谢物 Physapubescin 水平与 *norank_f_Lachnospiraceae* 丰度呈负相关 ($P<0.05$) (图 4B)。对与 EM 与 CM 组间 73 种命名的差异代谢物进行功能分析发现,共涉及 4 大类 KEGG level 3 通路 (图 4C),并在 7 条通路上显著富集,包括哮喘

相关 ($P<0.01$) (图 4A)。

在 CM 组中,代谢物 Homoveratric acid 水平与 *Lachnospiraceae_NK4A136_group*, *norank_f_Ruminococcaceae_Desulfovibrio*, *Unclassified_f_Lachnospiraceae_Ruminiclostridium_6* 丰度呈负相关 ($P<0.05$),与 *Ruminiclostridium_9* 丰度呈显著负相关 ($P<0.01$)。代谢物 Physapubescin 水平与 *norank_f_Lachnospiraceae* 丰度呈负相关 ($P<0.05$) (图 4B)。

对与 EM 与 CM 组间 73 种命名的差异代谢物进行功能分析发现,共涉及 4 大类 KEGG level 3 通路 (图 4C),并在 7 条通路上显著富集,包括哮喘

表 3 3 组门水平上的物种相对丰度(丰度排名前 20 位)

Table 3 Relative abundance of species at phylum (top 20 in abundance) level in three groups

门类	CO (n=5)		EM (n=5)		CM (n=5)		P
	中位数	四分位数间距 (1/4, 3/4)	中位数	四分位数间距(1/4, 3/4)	中位数	四分位数间距 (1/4, 3/4)	
拟杆菌门 Bacteroidetes	0.67	0.091(0.616,0.707)	0.65	0.037(0.618,0.655)	0.7	0.037(0.685,0.722)	0.37
厚壁菌门 Firmicutes	0.29	0.092(0.279,0.371)	0.29	0.066(0.241,0.307)	0.24	0.038(0.231,0.269)	0.33
变形菌门 Proteobacteria	0.016	0.011(0.01,0.021)	0.045	0.008(0.043,0.051)	0.039	0.011(0.029,0.04)	0.004 ¹⁾
疣微菌门 Verrucomicrobia	0.002	0.003(0,0.003)	0.026	0.044(0.009,0.053)	0.002	0(0.002,0.002)	0.026 ¹⁾
Saccharibacteria	0.001	0.002(0.001,0.003)	0.000 5	0.002(0,0.002)	0.002	0.002(0.001,0.003)	0.47
放线菌门 Actinobacteria	0.000 8	0(0.001,0.001)	0.002	0.001(0.002,0.003)	0.002	0.001(0.002,0.003)	0.18
软壁菌门 Tenericutes	0.000 6	0(0.001,0.001)	0.000 5	0.001(0,0.001)	0.001	0(0.001,0.001)	0.51
蓝藻门 Cyanobacteria	0	0.003(0,0.003)	0	0(0,0)	0.011 77	0.005(0.009,0.014)	0.006

注:与 CO 组比较¹⁾P<0.05(表 4 同)。

(asthma), FcεRI 信号通路(Fc epsilon RI signaling pathway), 非洲锥虫病(African trypanosomiasis), 硫胺素代谢(thiamine metabolism), 亚油酸代谢(linoleic acid metabolism), 维生素 B₆代谢(vitamin B₆ metabolism), 类单萜类合成(monoterpenoid biosynthesis)(图 4D)。

3.4 HYJDP 对内异症小鼠体内 LPS 影响 采取的是较为成熟的内异症造模方法。与 CO 组比较,内异症小鼠腹腔灌洗液、血清和肠壁匀浆中 LPS 含量明显升高(P<0.05);与 EM 组比较,而经 HYJDP 治疗后,内异症小鼠的小鼠腹腔灌洗液、血清和肠壁匀浆 LPS 含量均明显降低(P<0.05)。在病灶纤维化指标方面,用 HYJDP 处理后,小鼠内异灶 Vimentin 和 E-cadherin 蛋白表达明显降低(P<0.05)(表 5, 6, 图 5)。

3.5 HYJDP 网络药理学机制探讨 在这部分通过 TCMSP, Drugbank, Swiss-Prot/TrEMBL 3 个数据库依次获取了 HYJDP 主要中药的有效成分、作用靶点以及对应的小鼠基因。在有效靶点数量方面淫羊藿最多(216),其次为蒲黄(209),没药(191),大血藤(51),莪术(20)和乳香(11)。去重后发现, HYJDP 有效成分潜在作用靶点共 251 个,其中 Ptgs1, Ptgs2, Chrm1, Chrm2, Chrm3, Pgr, Gabra1, Ncoa2, Adra1b 靶点为 6 种中药共有(见图 6)。其中与 Toll-like receptor signaling pathway 相关的靶点有 15 个,分别是 IL-6, TNF, NF-κB, CXCL11,

CXCL10, Akt1, Fos, MAPK1, Jun, MAPK14, Caspase8, IL-1b, MAPK8, IκBκB 和 Spp1(见图 7)。

4 讨论

在本次研究中,虽然在内异症动物模型上验证了 HYJDP 的作用,与人体环境有较大差异,但不可否认的是 HYJDP 能够有效改善小鼠肠道代谢物水平,而这种改善伴随着肠道菌群多样性与丰富度的恢复而出现。此外,研究显示 HYJDP 对能够有效降低内异症小鼠体内 LPS 水平。这些结果将有助于内异症疾病在肠道微生态方面的研究。

子宫内膜异位症虽然是一种常见育龄期女性疾病,每年有大量的研究经费投入其中,但是其发病机制至今仍然不清楚,并且还未有一种非常有效的治疗手段出现^[25]。在内异症病灶的形成过程中,腹腔内免疫细胞功能出现异常,包括巨噬细胞吞噬能力下降、自然杀伤细胞细胞毒作用降低以及调节免疫细胞数量增多,使得腹腔内环境形成了免疫抑制状态,促进了内异症的形成^[26]。每月伴随内膜碎片进入腹腔的还有大量激素和炎症因子的月经血,不断刺激腹腔内免疫细胞,进而将腹腔内塑造为持续低反应炎症环境^[27]。虽然育龄期女性存在经血逆流的有 90%,但是内异症的发生率却在 10%左右^[28],这不得不促使寻找新证据来解释这种差异。肠道菌群是近年来的研究热点,在维持人体免疫、炎症、营养稳态等多方法有着重要作用^[29],并疾病的发生发展和药物的代谢有着密切联系^[30]。

表 4 3 组属水平上的物种相对丰度(丰度排名前 20 位)(n=5)

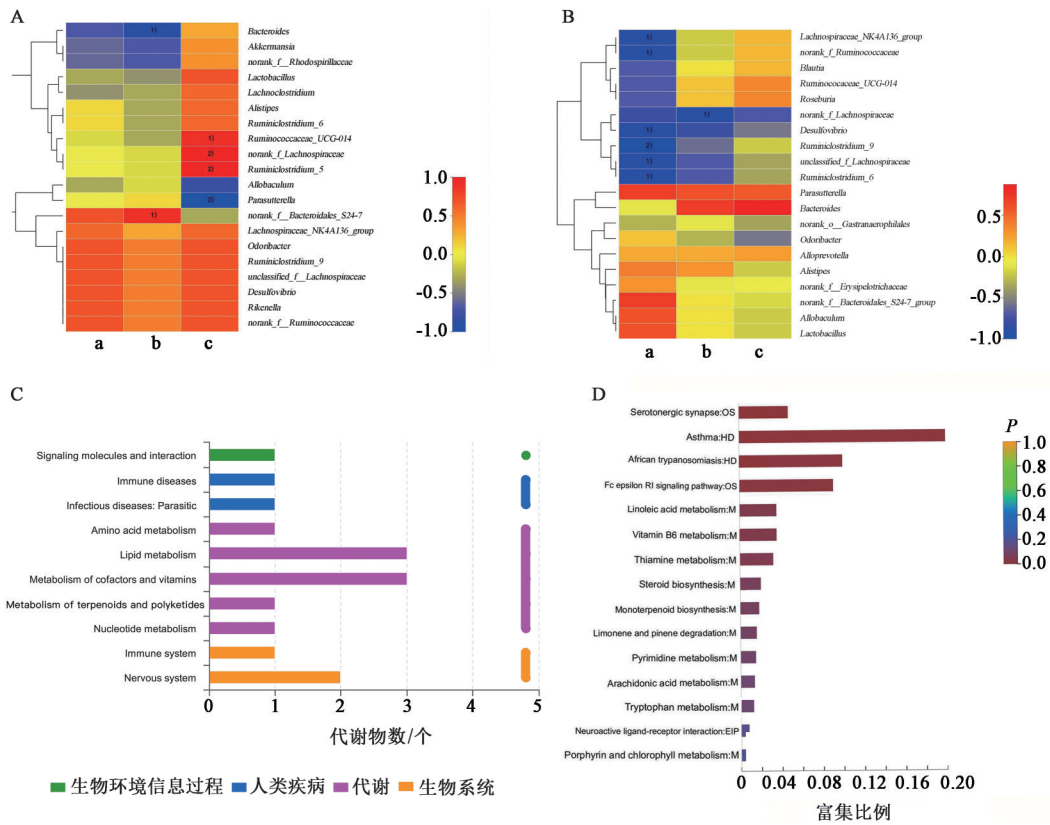
Table 4 Relative abundance of species at genus (top 20 in abundance) level in three groups (n=5)

属类	CO		EM		CM		P
	中位数	四分位数间距 (1/4,3/4)	中位数	四分位数间距 (1/4,3/4)	中位数	四分位数间距 (1/4,3/4)	
未明确分类_f_拟杆菌_S24-7_群 <i>norank_f_Bacteroidales_S24-7_group</i>	0.583 299	0.091(0.616,0.707)	0.62	0.065(0.563,0.628)	0.64	0.108(0.562,0.67)	0.565 5
毛螺菌科_NK4A136_群 <i>Lachnospiraceae_NK4A136_group</i>	0.076	0.092(0.279,0.371)	0.029	0.022(0.008,0.03)	0.082	0.034(0.051,0.085)	0.009 ¹⁾
乳酸菌 <i>Lactobacillus</i>	0.053	0.005(0.051,0.056)	0.004	0.001(0.004,0.005)	0.007	0.005(0.004,0.009)	0.009 ¹⁾
普雷沃氏菌科_NK3B31_群 <i>Prevotellaceae_NK3B31_group</i>	0.03	0.026(0.016,0.042)	0	0(0,0)	0	0(0,0)	0.002 ¹⁾
拟杆菌 <i>Bacteroides</i>	0.025	0.009(0.02,0.029)	0.015	0.006(0.012,0.018)	0.013	0.01(0.006,0.016)	0.013 ¹⁾
瘤胃菌科_UCG-014 <i>Ruminococcaceae_UCG-014</i>	0.019	0.025(0.015,0.04)	0.044	0.035(0.015,0.05)	0.011	0.006(0.009,0.015)	0.33
未归类_f_毛螺菌科 <i>Unclassified_f_Lachnospiraceae</i>	0.027	0.009(0.019,0.028)	0.006	0.006(0.002,0.008)	0.015	0.015(0.015,0.03)	0.008 ¹⁾
未明确分类_f_毛螺菌科 <i>norank_f_Lachnospiraceae</i>	0.016	0.003(0.014,0.017)	0.012	0.008(0.006,0.014)	0.03	0.015(0.021,0.036)	0.007 ¹⁾
另枝菌属 <i>Alistipes</i>	0.023	0.011(0.015,0.026)	0.019	0.009(0.011,0.02)	0.014	0.005(0.013,0.018)	0.14
布特劳氏菌属 <i>Blautia</i>	0.009	0.001(0.009,0.01)	0.002	0.001(0.001,0.002)	0.006	0.003(0.005,0.008)	0.04 ¹⁾
<i>Ruminiclostridium_9</i>	0.007	0.003(0.005,0.008)	0.006	0.004(0.002,0.006)	0.007	0.001(0.006,0.007)	0.275 3
<i>Parasutterella</i>	0.008	0.004(0.006,0.01)	0.032	0.024(0.023,0.047)	0.017	0.012(0.017,0.029)	0.004 ¹⁾
未明确分类_f_瘤胃菌科 <i>norank_f_Ruminococcaceae</i>	0.006	0.002(0.005,0.007)	0.009	0.008(0.001,0.009)	0.006	0.003(0.004,0.007)	0.960 8
氏菌属 <i>Roseburia</i>	0.004	0.001(0.004,0.005)	0.001	0.001(0,0.001)	0.006	0.005(0.005,0.01)	0.005 ¹⁾
脱硫弧菌属 <i>Desulfovibrio</i>	0.007	0.004(0.003,0.007)	0.005	0.007(0.002,0.009)	0.006 921	0.002(0.005,0.007)	0.677 1
<i>Akkermansia</i>	0.002	0.003(0,0.003)	0.026	0.044(0.009,0.053)	0.002	0(0.002,0.002)	0.026 ¹⁾
<i>Allobaculum</i>	0.001	0.003(0,0.003)	0.15	0.095(0.099,0.194)	0.021	0.02(0.004,0.024)	0.005 ¹⁾
<i>norank_o_Gastranaerophilales</i>	0	0.003(0,0.003)	0	0(0,0)	0.011	0.005(0.009,0.014)	0.006 ¹⁾
<i>Ruminiclostridium_6</i>	0.001	0.002(0,0.002)	0.006	0.006(0,0.006)	0.004	0.002(0.003,0.005)	0.23
拟普雷沃菌属 <i>Alloprevotella</i>	0	0(0,0)	0	0(0,0)	0.008	0.022(0,0.022)	0.03 ¹⁾

肠道菌群与内异症之间存在着微妙联系,两者之间的研究是目前较为新的研究领域^[31]。到目前为止,这两者之间的大部分研究都在动物模型上展开。最开始,BAILEY 等^[32]发现内异症恒河猴肠道菌群存在失调,并与肠道疾病发生率之间存在一定关联。后来,研究发现用小鼠构建内异症模型之后,小鼠肠道菌群出现了紊乱^[33],用抗生素治疗后能够抑制内异病灶生长,并改善腹腔内炎症环境。与这些研究不同的是,探讨 HYJDP 对内异症小鼠肠道菌群结构影响的同时,还加入了粪便代谢组学的研究,进一步拉近了肠道菌群与内异症的距离。相比正常组,内异症小鼠肠道菌群和粪便代谢物存在紊乱,而 HYJDP 能够改善内异症小鼠肠道内环境。

LPS 是一种革兰氏阴性菌外膜的重要组成部分

分,能引起宿主强烈的免疫反应,并作为细菌感染的早期预警信号。Toll-like receptor signaling pathway 是 LPS 作用的经典通路,能够激活炎症反应,促进人体内炎症环境的形成。LPS 能够刺激异位的子宫内膜基质细胞产生大量的肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-8 (IL-8),并增强人子宫内膜异位基质细胞的有丝分裂活性,本研究发现 HYJDP 可作用于这两种促炎因子;也能够通过上调环氧酶 2 (COX-2) 和前列腺素 E2 (PGE2) 的表达,促进人子宫内膜异位基质细胞的增殖和侵袭。动物研究发现,LPS 能够通过作用核转录因子- κ B (NF- κ B) 通路促进小鼠子宫内膜异位细胞增殖并抑制其凋亡,从而促进小鼠 EMS 病灶的生长^[34],在本次 HYJDP 网络药理学研究中发现 Toll-like receptor signaling



A.EM组代谢物与菌群相关性;B.CM组代谢物与菌群相关性;C.EM与CM比较差异代谢物KEGG功能;D.EM与CM比较差异代谢物KEGG富集;a.homoveratric acid;b.physapubescine;c.melilotoside C

图4 EM组与CM组差异代谢物与肠道菌群关联分析

Fig. 4 Correlation analysis of metabolites and intestinal flora between EM group and CM group

表5 3组腹腔灌洗液、血清和肠壁匀浆中LPS表达量比较 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 5 Comparison of LPS expression levels in abdominal supernatant, serum and intestinal wall homogenate of three groups ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	腹腔灌洗液	血清	肠壁
EM	2 365±139.7 ¹⁾	6 468±1084	68.18±19.33
CM	1 635±163.6 ²⁾	4 975±156.1 ²⁾	34.78±4.947 ²⁾
CO	933.4±65.162	3 692±287.5	17.15±7.228

注:与EM组比较¹⁾P<0.05;与CO组比较²⁾P<0.05。

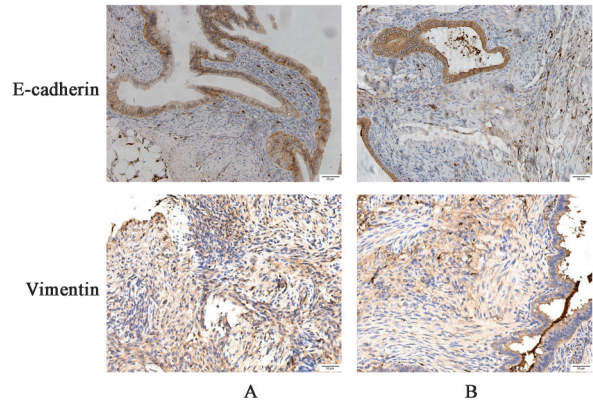
表6 EM组和CM组病灶Vimentin和E-cadherin蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 6 Comparison of Vimentin and E-cadherin protein expression between EM group and CM group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	Vimentin	E-cadherin
EM	0.22±0.01	0.30±0.01
CM	0.18±0.01 ¹⁾	0.26±0.01 ¹⁾

注:与EM比较¹⁾P<0.05。

pathway与NF-κB有联系,且可见NF-κB的作用靶点。本次研究发现,HYJDP能够降低肠壁组织、血清、腹腔液中LPS含量,并能够作用于Toll-like



A. EM组; B. CM组

图5 两组Vimentin和E-cadherin蛋白表达

Fig. 5 Protein expression of two groups of Vimentin and E-cadherin

receptor signaling pathway多种蛋白,控制炎症,抑制病灶的发生发展。HYJDP对内异症小鼠体内LPS的改善作用很有可能是通过调节肠壁屏障完成的,而肠道菌群在此过程中扮演着重要作用。此外,HYJDP有效成分能够作用异位病灶,减轻内异灶组织纤维化程度。

在临床实际工作中,HYJDP是以6种中药为主

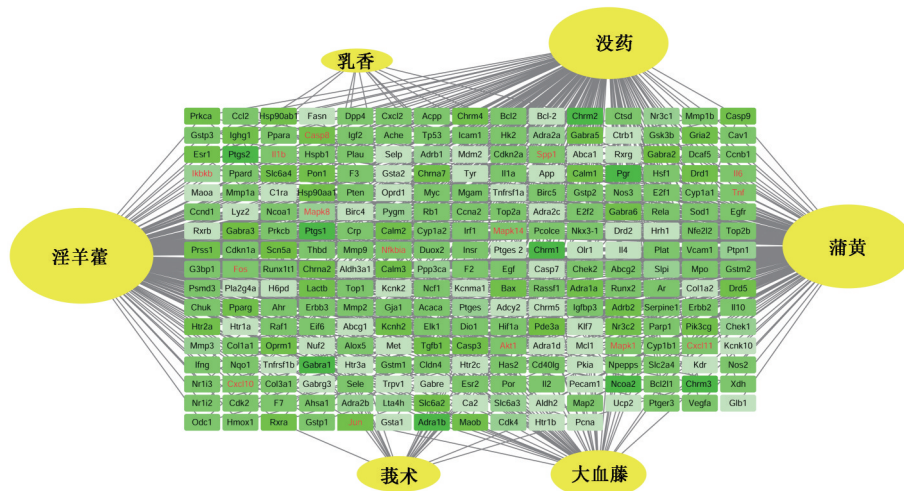


图 6 HYJDP 潜在作用靶点网络

Fig. 6 Network diagram of potential targets for HYJDP

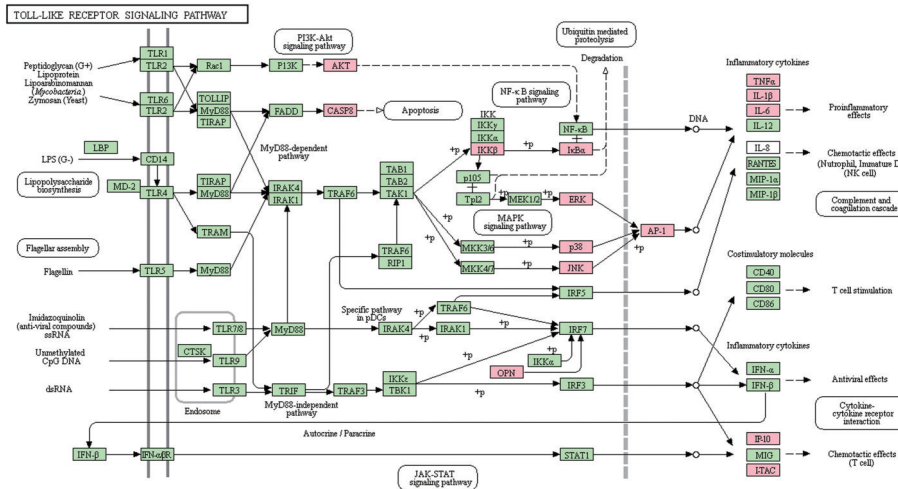


图 7 HYJDP 有关 Toll-like receptor signaling pathway 的作用靶点示意

Fig. 7 Schematic diagram of targets of HYJDP on Toll-like receptor signaling pathway

的方剂,会根据患者具体情况而加入其他中药一起使用,是临床用于治疗内异症的常用中药组方。先前研究显示,根据内异症患者具体症状而对 HYJDP 进行药味和剂量的调整,能够显著改善内异症患者痛经等症状^[19]。在本次研究中,中药治疗后,内异症小鼠肠道菌群丰富度和多样性显著恢复,粪便代谢物水平呈明显改善,主要以 homoveratric acid, melilotoside C 和 physapubescin 3 种重要代谢物的丰度恢复为特征。虽然并没有直接证据显示这 3 种代谢物与内异症发生发展存在关联,但是不会减弱它们作为疾病和药物治疗评估指标的潜在效能。通过相关性分析,进一步为内异症小鼠和 HYJDP 治疗后的肠道内环境构建了菌群与代谢物关联模型,而这是之前研究所不具备的。粪便代谢组学与肠道菌群的检测都是无创的。相比单纯测定肠道菌群

结构作为疾病评估指标,联合粪便代谢组学将使得这种评估结果更加可靠和全面。

在本次研究中选取 HYJDP 最为核心的 6 种中药作为整体用于研究,以此来避免临床因药物加减带来的混杂因素。利用网络药理学挖掘了 HYJDP 对小鼠的潜在作用靶点和相关功能通路,发现 HYJDP 对 Toll-like receptor signaling pathway 多个靶点还对小鼠卵母细胞成熟、免疫细胞功能、炎症因子通路、内分泌及代谢等相关通路具有作用靶点。可见, HYJDP 能够从多角度调整内异症小鼠状态。研究揭示了 HYJDP 能够有效改善患者肠道内环境,而将在接下来的研究中进一步探讨 HYJDP 对内异症模型小鼠血清、腹腔液中炎症因子和免疫细胞的影响。

综上所述, HYJDP 能够有效降低内异症小鼠外

周血和腹腔液中LPS水平,控制炎症的发生,并能够减轻病灶组织纤维化程度。此外,内异症小鼠肠道菌群与粪便代谢物均存在紊乱,而HYJDP能够改善紊乱的肠道环境。相比正常组, homoveratric acid, melilotoside C 和 physapubescin 这6种代谢物水平在HYJDP治疗前后变化较为明显,或许可以作为内异症治疗与评估的重要靶点。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] BULUN S E. Endometriosis[J]. N Engl J Med, 2009, 360(3):268-279.
- [2] FERRERO S, EVANGELISTI G, BARRA F. Current and emerging treatment options for endometriosis[J]. Expert Opin Pharmacother, 2018, 19:1109-1125.
- [3] ZONDERVAN K T, BECKER C M, KOGA K, et al. Endometriosis[J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4:9.
- [4] YU M, JIA H M, ZHOU C, et al. Urinary and fecal metabolomics study of the protective effect of chaihushu-gan-san on antibiotic-induced gut microbiota dysbiosis in rats[J]. Sci Rep, 2017, 7:46551.
- [5] LEONARDI M, HICKS C, F EL-ASSAAD, et al. Endometriosis and the microbiome: a systematic review [J]. BJOG, 2020, doi: 10. 1111/1471-0528. 15916.
- [6] THAISS C A, ZMORA N, LEVY M, et al. The microbiome and innate immunity [J]. Nature, 2016, 535:65-74.
- [7] KWON O, LEE S, KIM J H, et al. Altered gut microbiota composition in Rag1-deficient mice contributes to modulating homeostasis of hematopoietic stem and progenitor cells [J]. Immune Netw, 2015, 15:252-259.
- [8] CHEN Y Y, CHEN D Q, CHEN L, et al. Microbiome-metabolome reveals the contribution of gut-kidney axis on kidney disease[J]. J Transl Med, 2019, 17(1):5.
- [9] SWANN J R, TUOHY K M, LINDFORS P, et al. Variation in antibiotic-induced microbial recolonization impacts on the host metabolic phenotypes of rats[J]. J Proteome Res, 2011, 10(8):3590-3603.
- [10] YUAN M, LI D, ZHANG Z, et al. Endometriosis induces gut microbiota alterations in mice [J]. Hum Reprod, 2018, 33(4):607-616.
- [11] CHADCHAN S B, CHENG M, PARNELL L A, et al. Antibiotic therapy with metronidazole reduces endometriosis disease progression in mice: a potential role for gut microbiota[J]. Hum Reprod, 2019, 34(6):1106-1116.
- [12] 莫婷,刘马峰,程安春. 革兰氏阴性菌脂多糖运输系统的构成及作用机制[J]. 微生物学报, 2018, 58(9):1521-1530.
- [13] 张晓音,吴旻,李雨萌,等. 脂多糖的效应及其机理研究进展[J]. 动物医学进展, 2015, 36(12):133-136.
- [14] 王丽娜,周旭春. 肠道菌群与肠黏膜免疫及相关肠道疾病的研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2017, 29(4):494-497.
- [15] 尚秀敏,闫晶晶,李佩玲. 炎症因子与子宫内膜异位症相关性的研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2015, 49(2):136-138.
- [16] SIMPSON BRENT W, TRENT M STEPHEN. Pushing the envelope: LPS modifications and their consequences [J]. Nat Rev Microbiol, 2019, 17:403-416.
- [17] KHAN K N, KITAJIMA M, INOUE T, et al. Additive effects of inflammation and stress reaction on Toll-like receptor 4-mediated growth of endometriotic stromal cells[J]. Hum Reprod, 2013, 28:2794-2803.
- [18] KEYAMA K, KATO T, KADOTA Y, et al. Lipopolysaccharide promotes early endometrial-peritoneal interactions in a mouse model of endometriosis[J]. J Med Invest, 2019, 66:70-74.
- [19] SHAN J, YU C Q, CHENG W, et al. Clinical observations on treatment of 50 cases of endometriosis with Huayu Jiedu decoction combined with Huayu Sanjie Enema [J]. J Trad Chin Med, 2018, 59(23):2027-2030.
- [20] ZHANG R, ZHU X, BAI H, et al. Network pharmacology databases for traditional chinese medicine: review and assessment[J]. Front Pharmacol, 2019, 10:123.
- [21] YUAN M, LI D, ZHANG Z, et al. Endometriosis induces gut microbiota alterations in mice [J]. Hum Reprod, 2018, 33(4):607-616.
- [22] NI Z X, BI Y L, SUN S, et al. Effect of blood stasis caused by cold on the gut microbiota of endometriosis mice[J]. Chin J Integr Trad West Med, 2019, 39(10):1214-1218.
- [23] LIAO X, SONG L, ZENG B, et al. Alteration of gut microbiota induced by DPP-4i treatment improves glucose homeostasis [J]. Ebio Medicine, 2019, 44:665-674.
- [24] ZHOU L, NI Z X, CHENG W, et al. Characteristic gut microbiota and predicted metabolic functions in women with PCOS [J]. Endocr Connect, 2020, 9:63-73.

- [25] CZYZYK A, PODFIGURNA A, SZELIGA A, et al. Update on endometriosis pathogenesis [J]. *Minerva Ginecol*, 2017, 69(5):447-461.
- [26] SYMONS L K, MILLER J E, KAY V R, et al. The immunopathophysiology of endometriosis [J]. *Trends Mol Med*, 2018, 24(9):748-762.
- [27] KHAN K N, KITAJIMA M, HIRAKI K, et al. Escherichia coli contamination of menstrual blood and effect of bacterial endotoxin on endometriosis [J]. *Fertil Steril*, 2010, 94(7):2860-2863.
- [28] HALME J, HAMMOND M G, HULKA J F, et al. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis [J]. *Obstet Gynecol*, 1984, 64:151-154.
- [29] CHEN X, DEVARAJ S. Gut microbiome in obesity, metabolic syndrome, and diabetes [J]. *Curr Diab Rep*, 2018, 18(12):129.
- [30] 吴璐, 赖艳, 王莹, 等. 高通量测序技术研究蚕沙对湿阻中焦证大鼠肠道菌群的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(3):623-630.
- [31] LASCHKE M W, MENGER M D. The gut microbiota: a puppet master in the pathogenesis of endometriosis? [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2016, doi: 10.1016/j.ajog.2016.02.036.
- [32] BAILEY M T, COE C L. Endometriosis is associated with an altered profile of intestinal microflora in female rhesus monkeys [J]. *Hum Reprod*, 2002, 17(7):1704-1708.
- [33] HANTSCHER J, WEIS S, SCHÄFER K H, et al. Effect of endometriosis on the fecal bacteriota composition of mice during the acute phase of lesion formation [J]. *PLoS One*, 2019, 14(12):e0226835.
- [34] AZUMA Y, TANIGUCHI F, NAKAMURA K, et al. Lipopolysaccharide promotes the development of murine endometriosis-like lesions via nuclear factor-kappa B pathway [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2017, 77:1-9.

[责任编辑 周冰冰]