

引用:刚鑫,罗雯鹏,潘燎,王真权.复方芩柏颗粒对溃疡性结肠炎大鼠肠道菌群的调控及对肠道黏膜病理的影响[J].中医药导报,2025,31(1):53-60.

复方芩柏颗粒对溃疡性结肠炎大鼠肠道菌群的调控及对肠道黏膜病理的影响*

刚 鑫,罗雯鹏,潘 燎,王真权

(湖南中医药大学第二附属医院,湖南 长沙 410000)

[摘要] 目的:探究复方芩柏颗粒对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的溃疡性结肠炎(UC)模型大鼠肠道菌群的影响。方法:将42只健康SD雄性大鼠随机分为正常组12只和模型制备组30只,采用DSS构建大鼠UC模型,每组各取3只确定是否造模成功,将造模成功大鼠随机分为模型组(UC)、美沙拉秦组(ME)与复方芩柏颗粒组(QB)各9只,观察各组大鼠一般情况,记录疾病活动指数(DAI)评分,进行HE染色后观察肠道病理变化,运用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测大鼠血清炎症因子水平,高通量测序技术检测肠道菌群物种组成及丰度的变化,进行物种多样性分析。结果:模型组大鼠DAI评分高于正常组($P<0.01$),模型组大鼠结肠黏膜损伤严重,模型组白介素-6(IL-6)、白介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平显著升高,白介素-10(IL-10)水平较正常组显著降低($P<0.01$);与模型组比较,复方芩柏颗粒组大鼠DAI评分下降($P<0.01$),结肠黏膜损伤及淋巴细胞浸润减轻,IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平显著降低,IL-10水平显著升高($P<0.05$)。16S rDNA基因测序结果提示DSS诱导UC后小鼠肠道菌群多样性降低,给药后UC大鼠肠道菌群多样性升高。复方芩柏颗粒组Shannon指数及Simpson指数较模型组明显升高,Chao1指数较模型组下降($P<0.05$);复方芩柏颗粒组变形杆菌门、拟杆菌门相对丰度较模型组显著下降,厚壁菌门及放线菌门相对丰度较模型组显著上调($P<0.05$),复方芩柏颗粒组双歧杆菌属、唾液联合乳杆菌属、嗜黏蛋白-阿克曼氏菌属、杜氏杆菌属、理研菌属相对丰度较模型组显著上调,梭杆菌属、大肠埃希·志贺菌属、普拉梭菌、链球菌属、罗氏菌属、毛螺菌属的相对丰度下降($P<0.05$);LEFSe分析示复方芩柏颗粒组杆菌纲、乳酸杆菌属的相对丰度有升高趋势;PICRUSt2功能预测示复方芩柏颗粒组在氨基糖和核苷酸糖代谢、谷胱甘肽代谢、亚酸盐代谢、果糖和甘露糖代谢等功能通路上的相对丰度有上调趋势。结论:复方芩柏颗粒可通过调节肠道菌群的丰度和多样性、恢复菌群结构来影响肠道菌群,从而修复损伤的肠黏膜屏障。

[关键词] 溃疡性结肠炎;复方芩柏颗粒;肠道菌群;16S rDNA基因测序;大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2025)01-0053-08

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.01.010

Effect of Compound Qinbai Granules (复方芩柏颗粒) on Intestinal Flora Regulation and Intestinal Mucosal Pathology in Rats with Ulcerative Colitis

GANG Xin, LUO Wenpeng, PAN Liao, WANG Zhenquan

(The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410000, China)

[Abstract] Objective: To explore the effects of compound Qinbai granule on the intestinal flora of rats with ulcerative colitis (UC) induced by sodium dextran sulfate (DSS). Methods: Totally 42 healthy SD male rats were randomly divided into normal group ($n=12$) and model preparation group ($n=30$). UC model was established by DSS, and 3 rats were selected from each group to determine whether the modeling was successful. The successful model rats were randomly divided into model group (UC), mesalazine group (ME) and compound Qinbai granules group (QB), with 9 rats in each group. The general situation of rats was observed, and score the disease activity index (DAI) was recorded. The intestinal pathological changes under the

*基金项目:长沙市自然科学基金项目(kq2202482);湖南省中医药科研计划项目(2021020);湖南省自然科学基金项目(2023JJ60040);湖南省中医防治肛肠疾病临床研究中心(湘中医药[2022]93号);湖南省中医肛肠病学学科带头人(湘中医药[2022]4号)

通信作者:王真权,男,主任医师,教授,研究方向为肛肠疾病

biological microscope were observed after Hematoxylin-eosin (HE) staining. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detect levels of serum inflammatory factor, and high-throughput sequencing technology was used to detect the changes in the composition and abundance of intestinal flora species. Results: The model group showed higher DAI scores than normal group ($P<0.01$), and the pathological section showed that the colonic mucosa of rats was seriously damaged in model group. Compared with the normal group, the serum levels of IL-6, IL-1 β and TNF- α increased in model group, while the level of IL-10 decreased in model group ($P<0.01$). Compared with the model group, the DAI scores decreased in compound Qinbai granules group ($P<0.01$), and the colon injury was alleviated in compound Qinbai granules group. The levels of IL-6, IL-1 β and TNF- α decreased in compound Qinbai granules group, while level of IL-10 increased in compound Qinbai granules group ($P<0.05$). The sequencing of 16S rRNA gene showed a decreased diversity of intestinal flora in rats with UC induced by DSS, and the diversity of intestinal flora in UC rats increased after administration. The compound Qinbai granules group showed higher Shannon index and Simpson index than model group, while lower Chao1 index than model group ($P<0.05$). The compound Qinbai granules group showed lower relative abundance of Proteobacteria and Bacteroidetes than model group, while higher relative abundance of Firmicutes and Actinobacteria than model group ($P<0.05$). The abundance of Bifidobacterium, Salivary Lactobacillus, Mucinophilus Ackermann, Duraliella, and Physiobacteria in compound Qinbai granules group was significantly upregulated compared to the model group, while the relative abundance of Fusobacterium, Escherichia coli Shigella, Plasmobacter, Streptococcus, Rochella, and Trichospira decreased in compound Qinbai granules group ($P<0.05$). LefSe analysis showed an increasing trend in the relative abundance of Bacteroids and Lactobacillus genera in compound Qinbai granules group. PICRUSt2 functional prediction showed an upward trend in the relative abundance of the compound Qinbai granules group in functional pathways such as amino and nucleotide sugar metabolism, glutathione metabolism, linoleic acid oil metabolism, fructose and mannose metabolism. Conclusion: Compound Qinbai granules can affect the interacting flora by regulating its abundance and diversity, and restoring its structure, and then repair the damaged intestinal mucosal barrier.

[Keywords] ulcerative colitis; compound Qinbai granules; intestinal flora; 16S rDNA gene sequencing; rat

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis,UC)是一种炎症性肠道疾病,始于直肠并延伸到结肠近段,以反复肠黏膜损伤、血便、炎症为特征^[1],被世界卫生组织列为现代难治性疾病^[2]。UC的发病机制尚未完全阐明,目前普遍认为与肠道微生物群、饮食成分和遗传易感等有关。肠道菌群在宿主免疫防御和发育方面发挥着至关重要的作用,其失调会触发肠黏膜的异常免疫应答与过度炎症反应^[3-4],导致肠黏膜严重损伤,因此肠道菌群失调是溃疡性结肠炎的触发点^[5]。UC的西医治疗药物主要有类固醇、氨基水杨酸酯、免疫抑制剂和生物制剂^[6],然而,长期服用易出现严重副作用及不良反应,包括感染、高热和高复发率^[7],寻求有效的替代治疗迫在眉睫。中医药具有安全有效、多靶点的治疗特点,在治疗UC方面具有广阔前景。研究表明,中药对UC有良好的治疗作用,例如黄芩汤^[8]、葛根芩连汤^[9]、乌梅丸^[10]等。

UC属中医学“肠澼”“痢疾”“脏毒”等范畴,其病机为湿、热、痰、瘀之邪郁积于肠府,肠络受损,日渐蕴腐化脓,肠黏膜屏障损伤而发为本病^[11]。本病实证居多,以清热利湿解毒的治法为主^[12]。复方芩柏颗粒具有清热化湿、行气止痛之效。前期研究^[13]已证实,复方芩柏颗粒可通过上调转化生长因子 β 1 (TGF- β 1)等抑炎因子的表达以及下调白介素-17(IL-17)等炎症因子的表达,改善溃疡性结肠炎大鼠模型的炎症,且复方芩柏颗粒最佳浓度为2.52 g/(kg·d)。为进一步研究复方芩柏

颗粒对UC的治疗机制,本研究立足于肠道菌群是UC的主要发病机制之一^[5],通过高通量测序技术对UC大鼠肠道菌群进行16S rDNA基因测序,分析菌群丰度和物种组成的变化,探究复方芩柏颗粒对UC大鼠肠道菌群的影响,探索复方芩柏颗粒治疗UC的机制。

1 材 料

1.1 动物 健康SD雄性大鼠42只,6~7周龄,体质量(230±15)g,购于湖北贝恩特生物科技有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(鄂)2021-0027。大鼠饲养于SPF级环境中,饲养室温度(22±3)℃,相对湿度50%~60%,12 h:12 h明暗交替光照,实验前适应性喂养7 d。

1.2 药物与试剂 复方芩柏颗粒[药物组成:黄柏、槟榔、秦艽、防风(炒炭)、熟大黄、生地黄、当归尾、桃仁、延胡索、黄芩、泽泻,规格:6 g/包,批准文号:湘药制备字Z20080819,湖南中医药大学第二附属医院];美沙拉嗪肠溶片(黑龙江天宏药业股份有限公司生产,批号:20190109);葡聚糖硫酸钠(DSS)(Sigma公司,批号:PHL83846);IL-6 ELISA检测试剂盒(批号:EK0411)、IL-10酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒(批号:EK0417)、IL-1 β ELISA检测试剂盒(批号:EK0394)、TNF- α 试剂盒(批号:EK0527)均购自武汉博士德生物公司;粪便隐血检测试剂盒(远慕生物,批号:YM-TC0511),二甲苯(国药集团,批号:10023418);无水乙醇(国药集团,批号:

10009259);苏木素-伊红染液(三鹰公司,批号:B600020);DL2000 DNA Maker试剂盒(Takara公司,批号:3427A);AMPure XT beads试剂盒(Beckman公司,批号:A63880);NovaSeq 6000 SP Reagent Kit试剂盒(Illumina公司,批号:20028402)。

1.3 主要仪器 病理切片机(德国Leica);JK-6生物组织摊烤片机(武汉俊杰电子有限公司);BX53型生物显微镜(日本奥林巴斯);NovaSeq 6000测序仪(Illumina);Agilent 2100生物分析仪(安捷伦 Agilent 2100 Bioanaly);Qubit(Invitrogen Q33226)。

2 方 法

2.1 造模与分组 适应性喂养7 d后,按照随机数字表法分为正常组12只和模型制备组30只。模型制备组自由饮用5% DSS溶液^[14-15],正常组自由饮用纯净水,连续7 d后,从正常组和模型制备组各随机抽取3只,结合大鼠一般情况、结肠组织形态观察及病理切片观察,以确定造模是否成功。将造模成功的大鼠随机分为模型组、美沙拉嗪组与复方芩柏颗粒组各9只。

2.2 制备药剂及给药 用蒸馏水溶解配制成1 g/mL复方芩柏母液,按照灌胃浓度稀释成145 mg/mL复方芩柏溶液;用蒸馏水溶解配制成500 mg/mL美沙拉嗪母液,按照灌胃浓度稀释成15.5 mg/mL美沙拉嗪混悬液;称取5 g DSS溶解于100 mL蒸馏水配制成5% DSS饮用水,使用前溶液保持在4 °C。参考人体与大鼠等效剂量换算公式计算大鼠用药剂量,美沙拉嗪组大鼠灌胃给予美沙拉嗪混悬液,269.6 mg/(kg·d);复方芩柏颗粒组大鼠灌胃给予复方芩柏溶液2.52 g/(kg·d)(沿用课题组前期研究结果中最佳浓度^[13]),2 mL/次,2次/d,正常组和模型组大鼠灌胃给予等体积的生理盐水,2次/d,连续给药3周。

2.3 标本采集 将大鼠腹腔注射3%戊巴比妥钠深度麻醉,固定于大鼠手术台,在无菌操作下剖腹,穿刺抽吸2 mL腹主动脉血液,使用采血管进行收集,将所采集的血液标本置于超速控温离心机(4 °C,3 000 r/min,)中离心10 min,抽取上层清液并将其加入到预先标记好分组的EP管中以备用;在回盲部分离结肠,后将肠道置于生理盐水中,继续小心分离包裹在肠道周围的脂肪组织,收集粪便2~3 g,放入无菌EP管中,−80 °C冰箱保存,以备行高通量测序技术检测;取出6~8 cm结肠(在距肛门2 cm处向上),在取材组织病变明显处留取2 cm肠道组织标本,−20 °C冰箱保存备用。

2.4 观察指标

2.4.1 大鼠一般情况 自造模第1天开始,每天记录大鼠饮食、饮水、粪便、毛色和活动等一般情况,观察腹泻和便便程度,记录体质量,进行疾病活动指数(disease activity index, DAI)评分^[16](见表1),以评估大鼠状态。

表1 疾病活动指数评分标准

体质量下降	大便性状	大便隐血/肉眼血便	计分
0~≤1%	正常	正常(−)	0
2%~5%	非常软但成形	隐血阳性(+)	1
6%~10%	半稀便	肉眼血便(++)	2
11%~15%	稀便	肉眼血便(+++)	3
≥16%	较重稀便	肉眼血便(>+++)	4

2.4.2 结肠组织病理变化观察 将留取的结肠组织标本置

于中性甲醛(10%)溶液中固定,脱水完成后使用凝固石蜡油将其包埋,切片后进行苏木素-伊红(HE)染色,于显微镜下观察结肠组织的病理学改变情况,并根据大鼠结肠组织的病理变化进行评分^[17]。

2.4.3 ELISA检测血清IL-6、IL-10、IL-1β、TNF-α水平 将制备的血清按ELISA试剂盒说明书进行操作,测定血清IL-6、IL-10、IL-1β、TNF-α的含量。

2.4.4 高通量测序技术检测肠道菌群 粪便标本采集后,在各组中随机抽取5份,进行微生物组总DNA的提取,以16S rDNA的V3~V4可变区进行PCR扩增,上游引物序列:341F(5'-CCTACGGGNNGCWGCAG-3'),下游引物序列:805R(5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')。AMPure XT beads回收试剂盒回收PCR产物,使用AMPure XT beads纯化后用Qubit定量。对纯化后的PCR产物使用Agilent 2100生物分析仪和Illumina文库定量试剂盒进行评估,将合格的各上机测序文库梯度稀释后,使用NovaSeq 6000测序仪进行2×250 bp的双端测序。使用cutadapt(v1.9)软件去除RawData的引物序列和平衡碱基序列,FLASH(v1.2.8)软件进行拼接,利用Vsearch(v2.3.4)软件去除嵌合体序列,通过qiime dada2软件调用DADA2进行长度过滤和去噪。基于所获得的具体扩增子序列变体(amplicon sequence variant, ASV)和ASV(feature)丰度表格,进行alpha多样性分析和beta多样性分析,以NT-16S数据库进行物种注释。

2.5 统计学方法 采用SPSS 21.0软件进行数据统计,计量资料以“均数±标准差”($\bar{x}\pm s$)表示,若多组比较满足正态分布及方差齐性,采用单因素方差分析,组间比较时选择LSD法,如不满足正态分布及方差齐性则采用非参数秩和检验;计数资料以[n(%)]表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结 果

3.1 复方芩柏颗粒对大鼠一般情况的影响 造模后,正常组大鼠食欲旺盛,饮水正常,反应敏捷,粪便黑色呈麦粒状,大便隐血阴性;模型制备组大鼠体质量明显下降,易惊恐,进食与饮水减少,出现身体蜷缩、毛发竖立、行动迟缓、大便稀溏及便血症状。4组大鼠干预后DAI评分比较,差异均有统计学意义($P<0.01$),美沙拉嗪组及复方芩柏颗粒组在干预后以上症状有不同程度的减轻。模型组大鼠DAI评分显著高于正常组($P<0.01$),美沙拉嗪组及复方芩柏颗粒组大鼠DAI评分较模型组显著降低($P<0.01$),表明复方芩柏颗粒对UC具有治疗作用。(见表2)

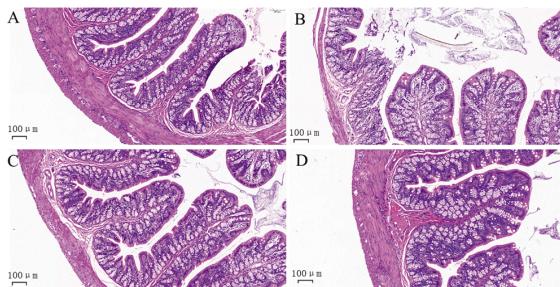
表2 各组大鼠 DAI 评分比较 ($\bar{x}\pm s$,分)

组别	n	干预前	干预后
正常组	9	0.11±0.17	0.07±0.15
模型组	9	3.51±0.38	3.18±0.29 ^a
美沙拉嗪组	9	3.56±0.33	1.44±0.33 ^{bc}
复方芩柏颗粒组	9	3.44±0.33	1.70±0.35 ^{bc}

注:与正常组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$;与给药前比较,^c $P<0.01$ 。

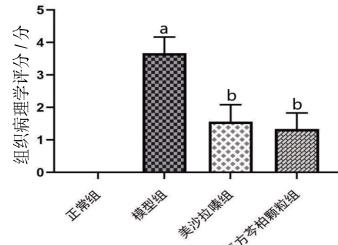
3.2 复方芩柏颗粒对大鼠结肠组织病理变化的影响 HE染色后,正常组大鼠肠腺上皮细胞结构正常,纹理清晰,腺体排

列整齐,隐窝正常,未见炎症细胞浸润,无损伤;模型组大鼠结肠组织结构严重破坏,黏膜层变薄,腺体缺失或排列不整齐,肠隐窝加深畸形,杯状细胞明显减少,大量炎症细胞浸润,见溃疡侵及肌层;与模型组比较,美沙拉嗪组及复方芩柏颗粒组大鼠结肠组织整体结构基本完整,腺体排列整齐,肠黏膜轻度水肿,可见较多正常杯状细胞及肠隐窝,炎症细胞明显减少,未见溃疡。4组大鼠结肠组织病理学评分比较,差异有统计学意义($P<0.01$);与正常组比较,模型组结肠组织病理学评分明显升高($P<0.01$);与模型组比较,美沙拉嗪组与复方芩柏颗粒组结肠组织病理学评分明显下降($P<0.01$)。(见图1~2)



注:A.正常组;B.模型组;C.美沙拉嗪组;D.复方芩柏颗粒组。

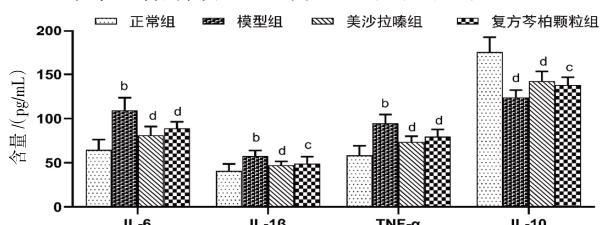
图1 大鼠结肠组织病理图 (HE染色, $\times 200$)



注:与正常组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$ 。

图2 各组大鼠结肠组织病理学评分比较 ($\bar{x}\pm s, n=9$)

3.3 复方芩柏颗粒对血清IL-6、IL-10、IL-1 β 、TNF- α 的影响 4组大鼠血清IL-6、IL-10、IL-1 β 、TNF- α 水平比较,差异均有统计学意义($P<0.01$)。模型组大鼠血清中促炎因子IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平显著高于正常组($P<0.01$),抗炎因子IL-10水平显著低于正常组($P<0.01$);与模型组比较,美沙拉嗪组及复方芩柏颗粒组大鼠血清IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平显著降低($P<0.01$),IL-10水平显著升高($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。(见图3)



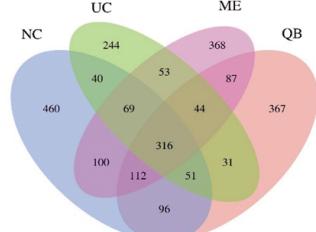
注:与正常组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与模型组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ 。

图3 各组大鼠血清炎症因子水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=9$)

3.4 复方芩柏颗粒对UC大鼠肠道菌群的影响

3.4.1 OTU分布Venn图 各组总OTU数分别为正常组1244个、模型组848个、美沙拉嗪组1149个、复方芩柏颗粒组1104个,各组特有OTU数分别为正常组460个、模型组244个、美沙拉嗪组368个、复方芩柏颗粒组367个。与正常组比较,模型组总

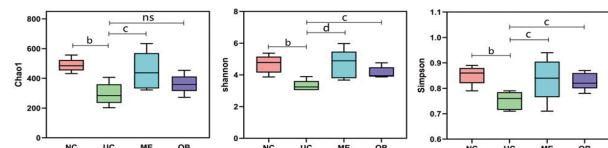
OTU数目及特有OTU数目均减少,与模型组比较,美沙拉嗪组及复方芩柏颗粒组总OTU数目及特有OTU数目均升高。4组共有OTU数目为316个,提示正常组、模型组、美沙拉嗪组及复方芩柏颗粒组的菌群结构存在较大差异。(见图4)



注:NC为正常组,UC为模型组,ME为美沙拉嗪组,QB为复方芩柏颗粒组。

图4 OTU分布Venn图

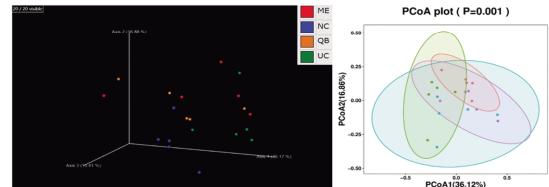
3.4.2 Alpha多样性分析 Alpha多样性分析主要用来反映物种丰富度和均匀度以及测序深度,包括Chao1、Shannon、Simpson等指数。4组大鼠Chao1、Shannon、Simpson指数比较,差异均有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。与正常组比较,模型组Chao1指数、Shannon指数、Simpson指数明显下降($P<0.01$);与模型组比较,美沙拉嗪组Chao1指数、Shannon指数及Simpson指数明显升高($P<0.05$),复方芩柏颗粒组Shannon指数及Simpson指数明显升高($P<0.05$),而Chao1指数差异无统计学意义($P>0.05$),结果提示造模后菌群多样性明显下降,美沙拉嗪和复方芩柏颗粒给药后可以在一定程度上回调菌群多样性,改善肠道菌群结构。表明复方芩柏颗粒能在一定程度上改善UC大鼠的肠道菌群结构,提升肠道微生物多样性。(见图5)



注:NC为正常组,UC为模型组,ME为美沙拉嗪组,QB为复方芩柏颗粒组。与NC比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与UC比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ 。

图5 Chao1稀释曲线及各组UC大鼠肠道菌群Alpha多样性分析

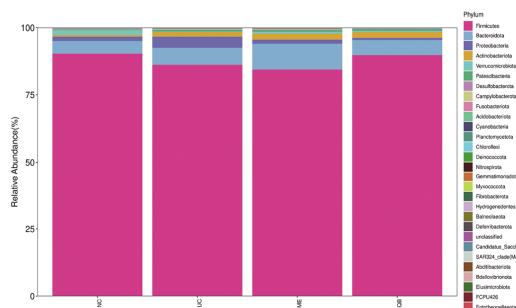
3.4.3 Beta多样性分析 Beta多样性是指不同环境群落之间的物种差异性。PCoA分析主要反映样品间物种组成结构差异,如bray_curtis_pcova 2D及3D图所示,样品距离越近,说明组别样品之间的微生物组成结构越相似,差异性越小。正常组与模型组样品菌群结构比较,具有较明显的差异,正常组与模型组距离较远,正常组与复方芩柏颗粒组、美沙拉嗪组的样品距离较近。(见图6)



注:NC为正常组,UC为模型组,ME为美沙拉嗪组,QB为复方芩柏颗粒组。

图6 基于bray-curtis的PCoA分析

3.4.4 肠道菌群物种注释及组成分析 门分类水平中占比较多的菌门有厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidota)、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinbacteriota)等。该分析采用柱状堆叠图选取丰度TOP30物种分类,各组UC大鼠厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门、放线菌门相对丰度差异均有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。与正常组比较,模型组门分类中厚壁菌门、放线菌门相对丰度显著下降($P<0.05$),变形杆菌门、拟杆菌门相对丰度显著上调($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,复方芩柏颗粒组门分类中变形杆菌门、拟杆菌门相对丰度显著下降($P<0.05$),厚壁菌门及放线菌门相对丰度显著上调($P<0.05$)。(见图7、表3)



注:NC为正常组,UC为模型组,ME为美沙拉嗪组,QB为复方芩柏颗粒组。

图7 各组大鼠菌群门分类水平物种柱状堆叠图

表3 各组样本门水平细菌构成比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	厚壁菌门	拟杆菌门	变形杆菌门	放线菌门
正常组	9	0.9159 ± 0.0405	0.0466 ± 0.0329	0.0161 ± 0.0014	0.0300 ± 0.0181
模型组	9	0.8408 ± 0.0582^a	0.0969 ± 0.0231^b	0.0451 ± 0.0368^a	0.0082 ± 0.0027^a
美沙拉嗪组	9	0.8315 ± 0.0362	0.1030 ± 0.0098	0.0171 ± 0.0080^b	0.0259 ± 0.0113^b
复方芩柏颗粒组	9	0.9167 ± 0.0211^c	0.0473 ± 0.0312^d	0.0081 ± 0.0023^d	0.0246 ± 0.0110^c

注:与正常组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与模型组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ 。

从属分类水平分析物种组成,与正常组比较,模型组唾液联合乳杆菌属、嗜黏蛋白-阿克曼氏菌属、茎点霉属、Erysipelotrichaceae_unclassified的相对丰度下降($P<0.05$),梭杆菌属、大肠埃希·志贺菌属、普拉梭菌、链球菌属、罗氏菌属、毛螺菌属、Clostridia_UCG-014_unclassified、Romboutsia、Muribaculaceae_unclassified的相对丰度上调($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,美沙拉嗪组、复方芩柏颗粒组双歧杆菌

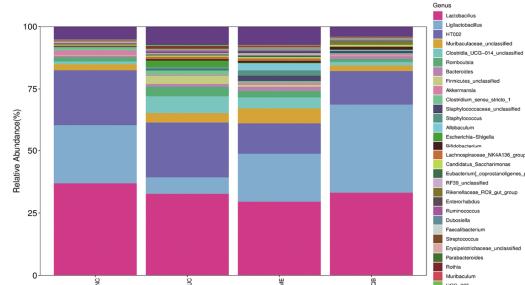
表4 各组样本属水平细菌构成比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	唾液联合乳杆菌属	嗜黏蛋白-阿克曼氏菌属	双歧杆菌属	杜氏杆菌属	理研菌属	茎点霉属	Erysipelotrichaceae_unclassified	梭杆菌属
正常组	9	0.2558 ± 0.0852	0.0197 ± 0.0214	0.0012 ± 0.0007	0.0003 ± 0.0001	0.0003 ± 0.0002	0.0032 ± 0.0025	0.0045 ± 0.0013	0.0113 ± 0.0053
模型组	9	0.0378 ± 0.0388^a	0.0028 ± 0.0009^a	0.0180 ± 0.0063	0.0015 ± 0.0011	0.0004 ± 0.0002	0.0009 ± 0.0008^a	0.0002 ± 0.0001^a	0.0217 ± 0.0099^a
美沙拉嗪组	9	0.2318 ± 0.1580^b	0.0193 ± 0.0091^c	0.0420 ± 0.0144^b	0.0094 ± 0.0096^b	0.0004 ± 0.0003	0.0040 ± 0.0015^d	0.0024 ± 0.0018	0.0062 ± 0.0040^b
复方芩柏颗粒组	9	0.3757 ± 0.1731^d	0.0190 ± 0.0057^c	0.0395 ± 0.0223^c	0.0100 ± 0.0040^b	0.0128 ± 0.0128^d	0.0013 ± 0.0010	0.0035 ± 0.0043^c	0.0034 ± 0.0025^d

组别	n	大肠埃希·志贺菌属	普拉梭菌属	链球菌属	罗氏菌属	毛螺菌属	Clostridia_UCG-014_unclassified	Romboutsia	Muribaculaceae_unclassified
正常组	9	0.0036 ± 0.0018	0.0029 ± 0.0010	0.0023 ± 0.0011	0.0004 ± 0.0002	0.0044 ± 0.0027	0.0109 ± 0.0111	0.0164 ± 0.0069	0.0287 ± 0.0141
模型组	9	0.0601 ± 0.0486^b	0.0055 ± 0.0030^a	0.0057 ± 0.0025^b	0.0041 ± 0.0030^b	0.0099 ± 0.0048^b	0.0672 ± 0.0607^a	0.0445 ± 0.0218^b	0.0657 ± 0.0320^a
美沙拉嗪组	9	0.0028 ± 0.0020^d	0.0028 ± 0.0011^c	0.0025 ± 0.0010^d	0.0009 ± 0.0002^d	0.0099 ± 0.0029	0.0223 ± 0.0112	0.0155 ± 0.0079^d	0.0599 ± 0.0168
复方芩柏颗粒组	9	0.0011 ± 0.0007^d	0.0015 ± 0.0005^d	0.0026 ± 0.0014^d	0.0006 ± 0.0004^d	0.0011 ± 0.0011^d	0.0141 ± 0.0085	0.0139 ± 0.0038^d	0.0224 ± 0.0172^c

注:与正常组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与模型组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ 。

属、唾液联合乳杆菌属、嗜黏蛋白-阿克曼氏菌属、杜氏杆菌属相对丰度显著上调($P<0.05$ 或 $P<0.01$),梭杆菌属、大肠埃希·志贺菌属、普拉梭菌、链球菌属、罗氏菌属的相对丰度下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。此外,与模型组比较,毛螺菌属、Muribaculaceae_unclassified仅在复方芩柏颗粒组中下调($P<0.01$),理研菌属、Erysipelotrichaceae_unclassified仅在复方芩柏颗粒组中上调($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。(见图8、表4)



注:NC为正常组,UC为模型组,ME为美沙拉嗪组,QB为复方芩柏颗粒组。

图8 各组大鼠菌群属分类水平物种柱状堆叠图

3.4.5 差异分析 LEfSe分析结果显示,复方芩柏颗粒可回调溃疡性结肠炎大鼠肠道菌群有益菌的丰度。杆菌纲(Bacilli)、乳酸菌科(Lactobacillaceae)、乳酸菌目(Lactobacillales)、理研菌属(Rikenellaceae_RC9_gut_group)、理研菌种(Rikenellaceae_RC9_gut_group)、巨球形菌属(Megasphaera)、奇异菌属(Atopobium)等13个肠道菌群类群在复方芩柏颗粒组有明显回调趋势。复方芩柏颗粒进一步提高了杆菌纲、乳酸杆菌属的相对丰度。(见图9)

3.4.6 PICRUSt2功能预测 基于16S rDNA基因测序数据,使用PICRUSt2进行基因功能预测,发现多种代谢途径在京都基因与基因百拉组丛书(KEGG)2级水平的组间存在显著差异,各组肠道菌群主要与碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)、能量代谢(energy metabolism)、氨基酸代谢(amino acid metabolism)、细胞过程和信号传导(cellular processes and signaling)、辅助因子和维生素代谢(metabolism of cofactors and vitamins)等多种代谢途径有关。(见图10)在京都基因与基因百拉组丛书(KEGG)3级水平进一步组间分析发现,复方芩柏颗粒组在氨基糖和核苷酸糖代谢(amino sugar and nucleotide sugar metabolism)、谷胱甘肽代谢(glutathione metabolism)、亚油酸代谢(linoleic acid metabolism)等途径上调。

metabolism)、果糖和甘露糖代谢 (fructose and mannose metabolism)、磷酸转移酶系统(phosphotransferase system)、伴侣与折叠催化剂(chaperones and folding catalysts)、双酚降解(bisphenol degradation) 等功能通路上的相对丰度上调。(见图11)

4 讨 论

中医药因其成本低、安全性及疗效好而成为UC的首选治疗方法^[18]。复方芩柏颗粒由古方“止痛如神汤”加减化裁而来。方中黄芩、黄柏为君药,功擅清热燥湿,泻火解毒,故名“复方芩柏颗粒”;槟榔、延胡索活血行气止痛,当归尾、桃仁活血化瘀,配以生地黄清热凉血,防风、秦艽祛风胜湿止痛,泽泻、槟榔利水渗湿,合为臣药;大黄凉血解毒、清热利湿,为佐使药。全方清热化湿,行气止痛,收敛止血。本课题组亦在前期研究中证实复方芩柏颗粒可改善UC模型大鼠的炎症^[13]。

实验组前期研究结果显示：复方芩柏颗粒可抑制Th17细胞分化而减少促炎因子产生，促进Treg细胞分化而增加抗炎因子产生。而Th17细胞产生的IL-17、IL-6等促炎因子能够使大量中性粒细胞聚集，并促进肠道炎症发生；Treg细胞可以产生IL-10等抗炎因子，抑制各种免疫细胞的活性，从而抑制肠道免疫反应和炎症的发生^[19]。此次研究也表明，复方芩柏颗粒可降低IL-6、IL-1β、TNF-α等Th17细胞分化的促炎因子水平，升

高IL-10等抗炎因子水平。与人体共生的肠道微生物以细菌为主,动态平衡的益生菌和条件致病菌构成了复杂的肠道菌群,维持着人体的健康^[20]。越来越多的证据表明,肠道微生物紊乱在UC的起病、进展及转归起着关键作用^[21-22]。有研究报道,革兰氏阴性类群(如大肠杆菌、志贺杆菌、梭杆菌、放线杆菌、链球菌和弯曲杆菌)丰度的增加将宿主-微生物平衡转向促炎表型^[23],相反,有益菌丰度的增加,如拟杆菌^[24]、嗜黏蛋白-阿克曼氏菌^[25]、双歧杆菌^[26]、*Erysipelotilostriatum*^[26],通过抑炎标志物的产生影响Th17/Treg免疫轴的平衡,从而抑制炎症反应,保护肠黏膜免受损伤。

本研究结果提示DSS诱导的UC大鼠菌群结构发生变化、肠道菌群多样性降低。肠道菌群紊乱是引起肠道炎症的重要原因。经复方芩柏颗粒治疗后的UC大鼠菌群结构趋于合理,表明复方芩柏颗粒可能通过提升大鼠肠道菌群的丰富度及均匀度发挥减轻肠道炎症的作用。DSS诱导的UC大鼠肠道中厚壁菌门、唾液联合乳杆菌属、嗜黏蛋白-阿克曼氏菌属等有益菌减少,变形杆菌门、拟杆菌门、梭杆菌属、大肠埃希·志贺菌属、普拉梭菌、链球菌属等致病菌增多。复方芩柏颗粒组UC大鼠肠道中致病菌明显减少,厚壁菌门、放线菌门、杆菌纲、乳酸杆菌属、双歧杆菌属、唾液联合乳杆菌属等有益菌显著增多,表明复方芩柏颗粒可抑制UC大鼠肠道致病菌定植,促进

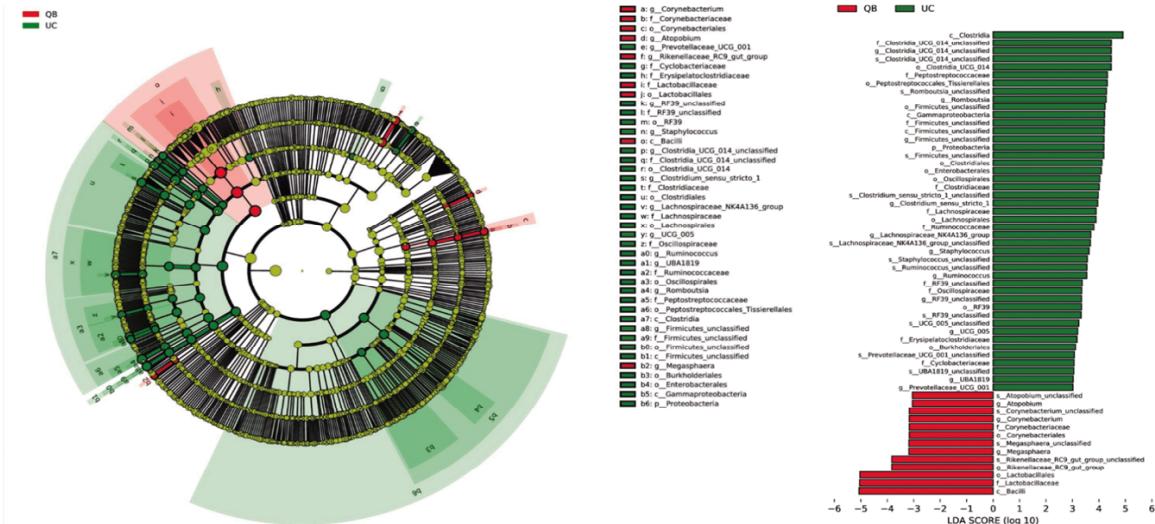


图 9 肠道菌群结构差异分析的 LEfSe 图

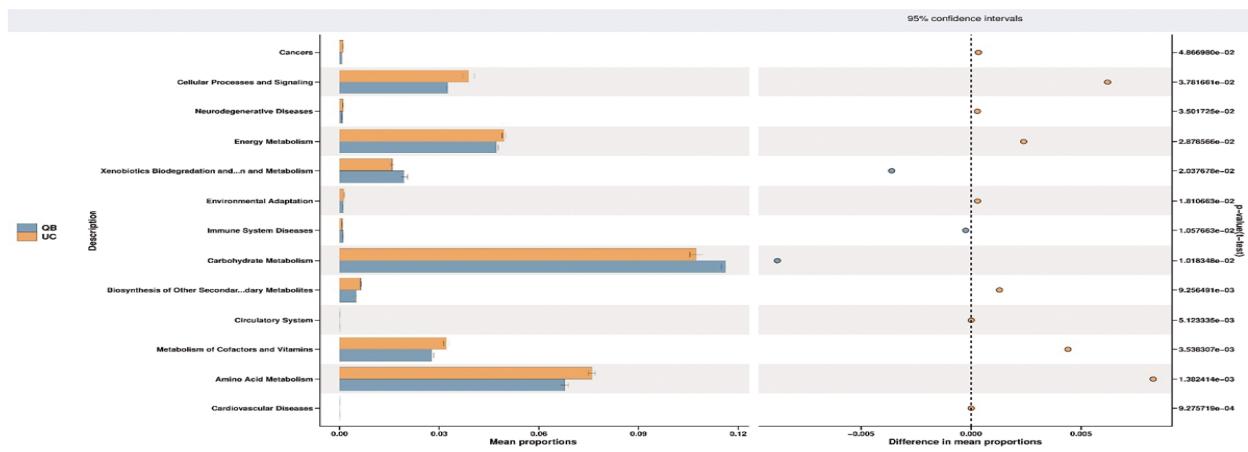


图 10 KEGG 2 级水平的肠道菌群功能预测分析

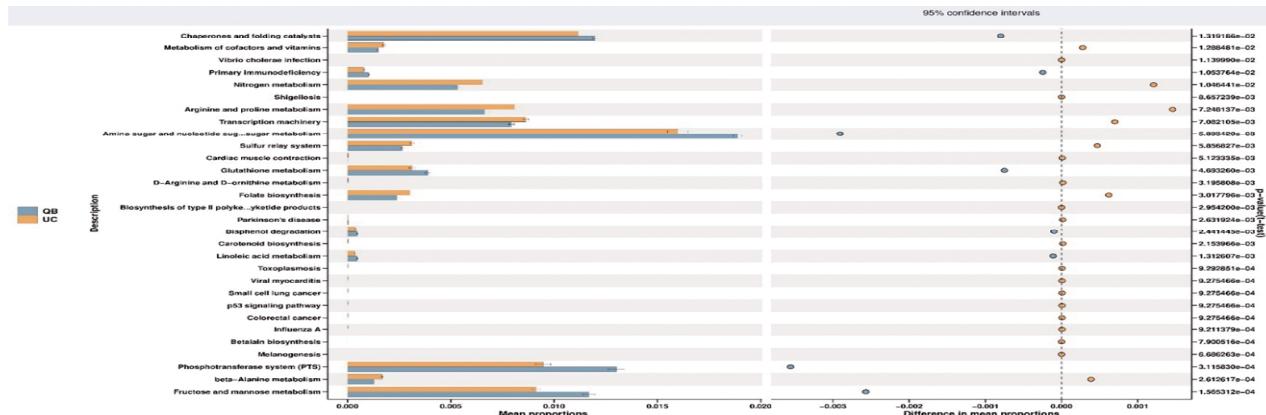


图 11 KEGG 3 级水平的肠道菌群功能预测分析

有益菌生长,从而促进菌群结构紊乱走向恢复趋势。因此,复方芩柏颗粒治疗UC大鼠的作用可能与调整这些有益菌及条件致病菌的比例密切相关。

肠道菌群最主要的碳源即多糖,能促进肠道内益生菌的生长增殖。多糖经过肠道菌群降解发酵生成的短链脂肪酸(short-chain fatty acids,SCFAs),具有调节肠道菌群平衡、调节机体免疫、抗炎、抗肿瘤等重要作用^[27]。氨基酸及其代谢物对维持肠道菌群也存在重要意义。有研究^[28]表明,色氨酸可通过犬尿氨酸途径代谢,调节免疫细胞平衡,发挥调节免疫细胞、肠道微生物群和肠道炎症的作用。PICRUSt2基因功能预测分析结果表明,复方芩柏颗粒可能通过干预肠道菌群的碳水化合物代谢、能量代谢、氨基酸代谢等途径,对溃疡性结肠炎大鼠的肠道菌群产生调节作用。进一步分析表明,复方芩柏颗粒主要关联的功能通路为氨基糖和核苷酸糖代谢、磷酸转移酶系统,其中磷酸转移酶系统可调节碳代谢及氮代谢、调节某些病原体的毒力、降低应激反应。因此,后续研究需探究复方芩柏颗粒如何通过上述相关功能途径,并基于何种具体分子机制达到治疗UC的作用。

综上所述,复方芩柏颗粒可通过调节肠道菌群的丰度和多样性、恢复肠道菌群结构来影响DSS诱导的UC大鼠肠道菌群,从而修复损伤的肠黏膜屏障。但由于复方芩柏颗粒方中药味偏多,其对UC大鼠的治疗作用可能是较多因素发挥作用的结果。该方基于肠道菌群治疗UC的具体分子作用机制与通路尚未明确,还需要更深入一步的研究。本研究发现复方芩柏颗粒对UC的治疗作用与该方对UC大鼠肠道菌群的调节作用关联密切,为进一步阐明该方对UC的治疗机制奠定了生物学与分子学基础。

参考文献

- [1] TAKU K, BRITTA S, CHEN W S, et al. Ulcerative colitis (primer) [J]. *Nature Reviews: Disease Primers*, 2020, 6(1): 1.
- [2] WANG Z G, YING X G, GAO P, et al. Anti-inflammatory activity of a peptide from skipjack (Katsuwonus pelamis) [J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(10): 582.
- [3] XIE Q, LI H Y, MA R, et al. Effect of Coptis chinensis franch and Magnolia officinalis on intestinal flora and intestinal barrier in a TNBS-induced ulcerative colitis rats model [J]. *Phytomedicine*, 2022, 97: 153927.
- [4] SHI G X, KONG J R, WANG Y L, et al. Glycyrrhiza uralensis Fisch. alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through inhibiting of NF- κ B signaling pathways and modulating intestinal microbiota [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 298: 115640.
- [5] 杜珊,周月,陈斌.中医药与肠道微生态相关性研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(18):182-188.
- [6] 刘润利,周铖,杜晓泉.溃疡性结肠炎的分期治疗[J].中国中西医结合消化杂志,2021,29(1):67-71.
- [7] ZOU Q H, ZHANG X, LIU X S, et al. Ficus carica polysaccharide attenuates DSS-induced ulcerative colitis in C57BL/6 mice [J]. *Food Funct*, 2020, 11(7): 6666-6679.
- [8] 刘雅清,徐航宇,王敦方,等.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[J].中国实验方剂学杂志,2023,29(7):11-19.
- [9] 黄文娟,卢学嘉,房其军,等.葛根芩连汤对湿热型溃疡性结肠炎大鼠结肠病理损伤及Th17/Treg的影响[J].中成药, 2021, 43(12): 3497-3501.
- [10] 马清林,任远,吴国泰,等.乌梅丸对2,4,6-三硝基苯磺酸诱导的溃疡性结肠炎大鼠的作用机制研究[J].中国临床药理学杂志,2021, 37(13): 1688-1691, 1704.
- [11] 黄茂光,谢胜,王金鑫,等.中药调节肠道菌群治疗溃疡性结肠炎的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2024, 30(2): 267-275.
- [12] 中华中医药学会脾胃病分会.溃疡性结肠炎中医诊疗专家共识意见(2017)[J].中华中医药杂志,2017, 32(8): 3585-3589.
- [13] 李克亚,王真权,张佳敏.复方芩柏颗粒剂对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织中ROR γ t、Foxp3表达的影响[J].中成药, 2019, 41(6): 1411-1415.
- [14] 茶亚飞,郭雪艳,李宝晶,等.葡聚糖硫酸钠自由饮用与灌胃诱导小鼠溃疡性结肠炎模型的比较[J].中国药理学通报, 2021, 37(5): 735-740.
- [15] 申睿,刘苗,朱向东,等.溃疡性结肠炎大鼠实验模型研究进展[J].中华中医药杂志,2018, 33(9): 3998-4001.

- [16] LUO S, WEN R Y, WANG Q, et al. Rhubarb Peony Decoction ameliorates ulcerative colitis in mice by regulating gut microbiota to restoring Th17/Treg balance[J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 231:39–49.
- [17] DING A G, WEN X H. Dandelion root extract protects NCM460 colonic cells and relieves experimental mouse colitis[J]. *J Nat Med*, 2018, 72(4):857–866.
- [18] LIU Y L, ZHOU M Y, YANG M, et al. Pulsatilla chinensis saponins ameliorate inflammation and DSS-induced ulcerative colitis in rats by regulating the composition and diversity of intestinal flora[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11:728929.
- [19] 周正华,冀建斌,康洪昌,等.青赤散对溃疡性结肠炎小鼠肠道菌群及Treg/Th17免疫平衡的影响[J].中华中医药杂志,2022,37(8):4438–4442.
- [20] 潘丹峰,苍玉珍,沈峰,等.健脾法联合肠内营养对溃疡性结肠炎大鼠肠道菌群的影响[J].新医学,2020,51(9):691–696.
- [21] 赵珈华,李亚彤,李玉婷,等.肠道菌群的功能及其在自身免疫病和过敏性疾病中的作用[J].国际免疫学杂志,2021,44(6):676–682.
- [22] 魏秀楠,王晗璐,孙大娟,等.基于肠道菌群探讨安肠愈疡汤联合美沙拉秦治疗溃疡性结肠炎的作用机制[J].时珍国医国药,2022,33(1):136–140.
- [23] GALIPEAU H J, CAMINERO A, TURPIN W, et al. Novel fecal biomarkers that precede clinical diagnosis of ulcerative colitis[J]. *Gastroenterology*, 2021, 160(5): 1532–1545.
- [24] NISHIHARA Y, OGINO H, TANAKA M, et al. Mucosa-associated gut microbiota reflects clinical course of ulcerative colitis[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):13743.
- [25] 毛慧芳,梁永林.黏质阿克曼菌及其代谢物短链脂肪酸与溃疡性结肠炎肠黏膜屏障的相关性研究[J].微生物学报,2023,63(4):1411–1431.
- [26] BU F, DING Y, CHEN T, et al. Total flavone of Abelmoschus Manihot improves colitis by promoting the growth of Akkermansia in mice[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 20787.
- [27] 李翠茹,彭买姣,谭周进.肠道菌群相关短链脂肪酸的研究进展[J].世界华人消化杂志,2022,30(13):562–570.
- [28] HAQ S, GRONDIN J A, KHAN W I. Tryptophan-derived serotonin-kynurenine balance in immune activation and intestinal inflammation[J]. *FASEB J*, 2021, 35(10): e21888.

(收稿日期:2024-03-06 编辑:罗英姣)

- (上接第31页) et al. Icaritin attenuates 6-OHDA-induced MN9D cell damage by inhibiting oxidative stress [J]. *PeerJ*, 2022, 10:e13256.
- [16] QUE R F, ZHENG J L, CHANG Z H, et al. Dl-3-n-butylphthalide rescues dopaminergic neurons in Parkinson's disease models by inhibiting the NLRP3 inflammasome and ameliorating mitochondrial impairment [J]. *Front Immunol*, 2021, 12:794770.
- [17] 黄丽,莫林宏,刘爱贤.养血清脑颗粒治疗阿尔茨海默病的疗效及对血管内皮生长因子的影响[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(14):121–126.
- [18] HE X, YUAN W, LI Z J, et al. 6-Hydroxydopamine induces autophagic flux dysfunction by impairing transcription factor EB activation and lysosomal function in dopaminergic neurons and SH-SY5Y cells[J]. *Toxicol Lett*, 2018, 283:58–68.
- [19] LI L R, LI Q H, HUANG W B, et al. Dapagliflozin alleviates hepatic steatosis by restoring autophagy via the AMPK-mTOR pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:589273.

- [20] ZHOU L N, CHENG Y. Alpha-lipoic acid alleviated 6-OHDA-induced cell damage by inhibiting AMPK/mTOR mediated autophagy[J]. *Neuropharmacology*, 2019, 155:98–103.
- [21] WANG W S, LV R X, ZHANG J J, et al. circSAMD4A participates in the apoptosis and autophagy of dopaminergic neurons via the miR-29c-3p mediated AMPK/mTOR pathway in Parkinson's disease[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(1):540.
- [22] XU J, AO Y L, HUANG C H, et al. Harmol promotes α -synuclein degradation and improves motor impairment in Parkinson's models via regulating autophagy-lysosome pathway[J]. *NPJ Parkinsons Dis*, 2022, 8(1):100.
- [23] YU F Q, MA R C, LIU C G, et al. SQSTM1/p62 promotes cell growth and triggers autophagy in papillary thyroid cancer by regulating the AKT/AMPK/mTOR signaling pathway[J]. *Front Oncol*, 2021, 11:638701.

(收稿日期:2023-05-10 编辑:李海洋)