

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

陈健^{1,2}, 张梁坤¹, 谷文超¹, 张新生³, 李灵¹, 韩涛^{1*}, 刘西建^{1*}, 黄海量^{1*}

(1. 山东中医药大学, 山东 济南 250300; 2. 济南市中心医院 中医科, 山东 济南 250013;

3. 临朐张新生中医诊所(新生堂), 山东 临朐 262600)

[摘要] 观察半夏泻心汤对右旋葡聚糖硫酸钠诱导建立的溃疡性结肠炎(DSS-UC)小鼠模型炎症因子及肠道菌群的影响,从菌群紊乱角度探讨其治疗溃疡性结肠炎的作用机制。将40只C57BL/6J小鼠随机分为空白组10只、模型组15只和半夏泻心汤组15只,采用2.5% DSS诱导溃疡性结肠炎模型,第8天开始每日对应给予生理盐水、生理盐水、半夏泻心汤14 d后,HE染色法观察结肠组织病理学变化,ELISA法检测血清炎症因子含量,运用16S rRNA测序技术检测小鼠粪便肠道菌群的变化。与空白组比较,模型组小鼠结肠组织损伤严重,血清白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,半夏泻心汤组小鼠结肠损伤减轻,血清IL-6和TNF- α 含量显著下降($P < 0.05$);造模后,肠道微生物在门水平上Patescibacteria丰富度显著增加($P < 0.05$);在属水平上Faecalibaculum($P < 0.01$)、norank_f_Muribaculaceae($P < 0.01$)丰富度显著减少,Turicibacter($P < 0.01$)、Romboutsia($P < 0.01$)、Clostridium_sensu_stricto_1($P < 0.01$)丰富度则显著增加。半夏泻心汤干预后,在门水平上Patescibacteria明显减少($P < 0.05$);在属水平上,Lactobacillus($P < 0.01$)、Clostridium_sensu_stricto_1($P < 0.01$)、Enterorhabdus($P < 0.01$)、Candidatus_Saccharimonas($P < 0.05$)、Eubacterium_fissicatena_group($P < 0.05$)显著减少,而Dubosiella、Bacteroides、Allobaculum则显著增加。综上所述,半夏泻心汤可以显著改善DSS-UC小鼠症状,降低IL-6和TNF- α 含量;并可在门水平上降低Patescibacteria丰富度,属水平上降低Clostridium_sensu_stricto_1、Candidatus_Saccharimonas、Eubacterium_fissicatena_group丰富度,提高Bacteroides、Bifidobacterium丰富度,进而起到减轻肠道炎症和治疗溃疡性结肠炎的作用。

[关键词] 溃疡性结肠炎; 半夏泻心汤; 炎症因子; 肠道菌群

Effect of Banxia Xiexin Decoction on intestinal flora of mice with ulcerative colitis induced by dextran sodium sulfate

CHEN Jian^{1,2}, ZHANG Liang-kun¹, GU Wen-chao¹, ZHANG Xin-sheng³, LI Ling¹, HAN Tao^{1*},

LIU Xi-jian^{1*}, HUANG Hai-liang^{1*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250300, China;

2. Department of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan Central Hospital, Ji'nan 250013, China;

3. Zhang Xin-sheng Chinese Medicine Clinic (Xinsheng Hall), Linqu 262600, China)

[Abstract] The aim of this paper was to investigate the effect of Banxia Xiexin Decoction (BXD) on inflammatory factors and intestinal flora in a dextran sulfate sodium induced ulcerative colitis (DSS-UC) mouse model, and to explore the mechanism of BXD in treating ulcerative colitis from the perspective of flora disorder. Forty C57BL/6J mice were randomly divided into control group, model

[收稿日期] 2020-09-08

[基金项目] 山东中医药大学首批科研创新优秀团队项目(220316);山东省重点研发计划项目(2016CYJS08A01-6);2020年度山东省中医药科技面上项目(2020M096);2020年齐鲁卫生与健康领军人才培养工程项目(鲁卫人才字[2020]3号);山东省高等学校科技发展计划项目(J18KB130);全国名老中医药专家刘特年传承工作室建设项目(国中医药人教发[2014]20号);山东省名老中医药专家刘昭纯传承工作室建设项目(鲁卫中发展字[2018]1号)

[通信作者] * 黄海量, 博士, 教授, 硕士生导师, E-mail: 06000031@sutcm.edu.cn; * 刘西建, 副教授, 硕士生导师, E-mail: liuxijian6500@163.com; * 韩涛, 博士生导师, E-mail: ht526@sina.com

[作者简介] 陈健, 博士研究生, E-mail: chenjian860103@163.com

group and BXD group. A 2.5% DSS-induced ulcerative colitis model was established. On the 8th day, normal saline, normal saline, and BXD were given daily for 14 days. After 14 days, HE staining was used to observe histopathological changes of the colon. Serum inflammatory factor content was detected by ELISA, and the change of intestinal flora in mice feces was detected by 16S rRNA sequencing technology. Compared with control group, the colonic tissue of mice in model group was damaged seriously, and the contents of IL-6 and TNF- α in serum were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with model group, mice in BXD group had less colonic damage, and the contents of IL-6, TNF- α in serum were decreased significantly ($P < 0.05$). After creation, the richness of Patescibacteria was increased significantly at the phylum level ($P < 0.05$). At the same time, the richness of *Faecalibaculum* ($P < 0.01$), *norank_f_Muribaculaceae* ($P < 0.01$) were decreased significantly at the genus level, while the richness of *Turicibacter* ($P < 0.01$), *Romboutsia* ($P < 0.01$), *Clostridium_sensu_stricto_1* ($P < 0.01$) were increased significantly. After the intervention with BXD, the content of Patescibacteria was significantly reduced at the phylum level ($P < 0.05$), and the contents of *Lactobacillus* ($P < 0.01$), *Clostridium_sensu_stricto_1* ($P < 0.01$), *Enterorhabdus* ($P < 0.01$), *Candidatus_Saccharimonas* ($P < 0.05$), *Eubacterium_fissicatena_group* ($P < 0.05$) were decreased significantly at the genus level, while the contents of *Dubosiella*, *Bacteroides* and *Allobaculum* were increased significantly. Therefore, BXD could significantly improve the symptoms of DSS-UC mice. It not only could reduce the contents of IL-6 and TNF- α , but also could reduce the richness of Patescibacteria at the phylum level, and those of *Clostridium_sensu_stricto_1*, *Candidatus_Saccharimonas*, *Eubacterium_fissicatena_group* at the genus level. In addition, BXD could increase the richness of *Bacteroides* and *Bifidobacterium*. It suggested that BXD could play a role in the treatment of ulcerative colitis partially through reducing inflammatory factors and regulating the structure of the gut microbiota.

[Key words] ulcerative colitis; Banxia Xiexin Decoction; inflammatory factors; intestinal flora

DOI: 10.19540/j.cnki.cjmm.20210119.401

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是以弥漫性结肠黏膜炎症为病理特征,以黏液脓血便或血性腹泻、里急后重为主要临床表现,并伴有腹痛、乏力、食欲减退、发热等全身症状的慢性非特异性复发性疾病^[1]。该病病程漫长,迁延不愈,反复发作,现已成为临床常见疾病^[2-3]。近年来的研究显示,在全球范围内 UC 的发病率逐年增加^[4-5];同时更令人担忧的是,UC 与结肠癌的发生发展密切相关,其可大大增加罹患结肠癌的机率^[6-10]。因此,UC 的相关临床及实验研究具有重要意义。近年来的相关研究揭示,UC 的发生发展与肠道微生态的失衡密切相关,故积极恢复 UC 患者肠道微生物稳态成为治疗 UC 的热点。肠道菌群是人体肠管中微生物菌落的统称,其数量庞大、种类繁多,编码基因数约是人体自身基因的 100~150 倍,被称作“人体第二基因组”^[11-13]。健康的肠道菌群稳态有助于人体正常的生理代谢活动、免疫调节及病原体抵抗^[14],若菌群稳态被打破,致病菌与有益菌结构失衡则会导致众多疾病的发生,如心血管疾病^[15]、炎症性肠病^[16-17]、代谢紊乱^[18-20]等,且疾病亦会加剧菌群失衡,进一步加重病情。大量研究表明,中医药可以通过干预人体肠道菌群稳态以达到治疗疾病的目的^[21-25]。

大量临床研究及 Meta 分析^[26-32]证明,半夏泻心汤(Banxia Xiexin Decoction, BXD)治疗 UC 疗效较

佳,可大大改善患者临床症状、缩短病程、减少复发率。但其是否通过调节肠道菌群发挥治疗作用,目前未有明确报道。基于此,本研究通过 16S rRNA 测序,探究半夏泻心汤对 DSS-UC 小鼠的治疗作用及其对肠道菌群的影响,以期半夏泻心汤的合理应用及治疗 UC 的可能机制提供实验依据。

1 材料

健康 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,6 周龄,体重(20 \pm 2)g,40 只,由北京维通利华实验动物繁育有限公司提供,许可证号 SCXK(京)2016-0006,质量合格证号 1100111911073034。所有小鼠均在 SPF 级标准实验室中,均自由取食(给予常规饲料),明暗周期为 12/12 h,环境温度(23 \pm 1.5) $^{\circ}$ C,相对湿度 60% \pm 10%。动物饲养使用的标准鼠饲料和水以及所有动物实验均按照山东中医药大学动物伦理委员会相关规定进行。

半夏泻心汤组成:清半夏(批号 190501) 56.16 g、干姜(批号 190101) 67.39 g、黄连(批号 180501) 22.46 g、黄芩(批号 190301) 67.39 g、人参(批号 190401) 67.39 g、炙甘草(批号 181106) 67.39 g 和大枣(批号 190506) 44.93 g,以上药物均采自山东百味堂中药饮片有限公司,并经山东省中医药研究院中药资源研究室靳光乾研究员鉴定均为真品。生药加 8 倍量蒸馏水,冷浸 30 min,文火开锅微沸煎煮

30 min 后,倾出药液,趁热过滤,去滓再煎至 720 mL 药液,4 ℃ 保存备用;右旋葡聚糖硫酸钠(DSS,美国 MP 公司,相对分子质量 36 000 ~ 50 000,批号 S2839);DNA 抽提试剂盒(美国 Omega Bio-Tek 公司,型号 OMEGA-soil DNA Kit);FastPfu Polymerase FastPfu(中国 TransGen 公司,型号 FastPfu Polymerase);MISEQ 测序仪(美国 Illumina 公司,型号 Illumina Miseq);高速台式冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司,型号 Eppendorf 5424R);超微量分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司,型号 NanoDrop2000);电泳仪(中国北京市六一仪器厂,型号 DYY-6C)。

2 方法

2.1 动物分组与造模

40 只 C57BL/6J 雄性小鼠适应性喂养 7 d 后,采用随机数字表法随机分为 3 组:空白组 10 只、模型组与半夏泻心汤组各 15 只。采用 2.5% DSS 自由饮用 7 d 的方法对除空白组之外的所有组别小鼠建立模型。记录实验小鼠每天体质量等一般状况。

2.2 半夏泻心汤给药剂量计算

山东中医药大学韩涛教授认为经方原方用药比例的确定对于经方原方的研究与应用具有重要意义;课题组前期通过考证认定半夏泻心汤原方用药比例当符合半夏-黄芩-干姜-人参-炙甘草-黄连-大枣 2.5 : 3 : 3 : 3 : 3 : 1 : 2,且半夏用量为 34.8 g^[33]。因半夏泻心汤原方中有毒药物半夏的用量为 34.8 g,远超过《中国药典》(2015 年版)中规定的安全剂量(9 g)为基准,按半夏泻心汤原方用药比例计算成人每日的用药量,即半夏 9 g、黄芩 10.8 g、干姜 10.8 g、人参 10.8 g、炙甘草 10.8 g、黄连 3.6 g、大枣 7.2 g。并根据公式[小鼠灌胃量(g·kg⁻¹) = 成人每日临床常用量/成人体质量(70 kg) × 9.1]计算得小鼠日给生药量为 8.19 g·kg⁻¹。

2.3 给药

自实验第 8 天起,各组小鼠每天于 7:30—8:30,15:30—16:30 灌胃 2 次,连续灌胃 14 d。空白组、模型组均用生理盐水灌胃;半夏泻心汤组用半夏泻心汤水煎液灌胃。

2.4 一般情况

每天观察小鼠的饮食、饮水、粪便、被毛、活动和精神状态等一般临床情况并详细记录腹泻及血便程度。

2.5 疾病活动指数(disease activity index, DAI) 检测

根据文献[34-35],按动物体质量下降百分率(体质量未下降为 0;下降 ≤ 5%,且 > 0 为 1 分;下降 ≤ 10%,且 > 5% 为 2 分;下降 ≤ 15%,且 > 10% 为 3 分;下降 > 15% 为 4 分)、大便黏稠度(正常为 0,松散的大便为 2 分,腹泻为 4 分)和大便出血(正常 0 分,隐血阳性为 2 分,显性出血为 4 分)情况进行综合评分,将 3 项结果的总分除以 3 即得到 DAI,DAI = (体质量指数 + 大便黏稠度指数 + 出血情况指数) / 3。

2.6 炎症因子白细胞介素 6(IL-6) 和肿瘤坏死因子-α(TNF-α) 的水平

摘眼球法获取小鼠血液,常温静置 30 min,于 4 ℃,3 500 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上清液,-80 ℃ 保存待测。酶联免疫方法测定各组小鼠血清中 IL-6 及 TNF-α 的含量。

2.7 组织病理

截取小鼠结肠远端,常规石蜡包埋,切片,HE 染色后进行光镜下病理组织观察。

2.8 大便肠道菌群的检测与分析

实验第 21 天轻柔小鼠腹部,获取每只小鼠粪便。分别将空白组 10 只小鼠、模型组 11 只小鼠和半夏泻心汤组 12 只小鼠的粪便分别混合再均分为 3 份,共获取 9 个样本,经 DNA 提取、PCR 扩增纯化、Illumina 测序及序列数据质控获取操作单元(operational taxonomic unit, OTU) 对应的分类单元(包括门、纲、目、科、属、种)及其相应的丰度信息。

2.9 统计学分析

数据分析采用 SPSS 26.0 和 Graphpad Prism 8 统计学软件包,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。2 组间数据比较采用 Student's-T test 方法检测,多组间数据差异进行 One-way ANOVA 分析。并使用 Graphpad Prism 8 作图。肠道菌群数据采用上海美吉生物医药科技有限公司生物云平台进行统计分析。 $P < 0.05$ 代表差异具有统计学意义。

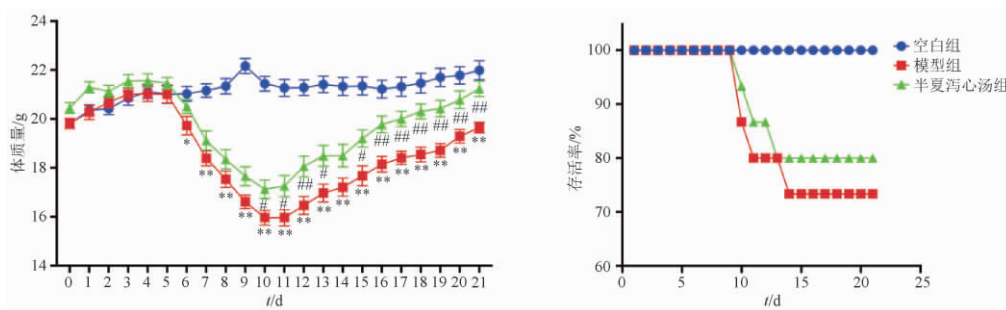
3 结果

3.1 一般体征

实验开始后对每组小鼠每天的体质量、饮水量、摄食量、背毛等情况记录分析。空白组小鼠饮水量、摄食量及背毛正常,体质量呈稳步增长趋势;其余各组小鼠在造模后饮水及摄食明显减少、喜扎堆嗜睡,背毛蓬松粗糙且无光泽,且自造模第 6 天起,各造模组小鼠体质量显著下降,并出现大便塘稀甚或血便。

模型组在实验第 11 天时达到最低点,半夏泻心汤组小鼠体质量在实验第 10 天,即给药第 3 天便出现回升趋势,且回升趋势较模型组更加显著,半夏泻心汤组小鼠的体质量在给药第 6 天起与模型组小鼠体质量有显著性差异;半夏泻心汤组在给予药物治疗后,

小鼠活动量及背毛显著改善;除空白组外,其余各组小鼠均有死亡(模型组死亡 4 只,半夏泻心汤组死亡 3 只),且实验鼠死亡主要集中在实验第 10~11 天(图 1)。由此可见,半夏泻心汤可以改善 DSS-UC 小鼠的一般状态,降低死亡率。



空白组样本量 10,模型组样本量 11,半夏泻心汤组样本量 12;与空白组比较* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ (图 2,4,7 同)。

图 1 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一般情况的影响

Fig.1 Effects of Banxia Xiexin Decoction on general situation of mice with ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium

3.2 DAI 评分

于实验第 7、14、21 天固定时间评价各组小鼠 DAI 评分。结果显示,在实验第 7 天,即造模结束时,与空白组相比,各造模组小鼠 DAI 评分均显著升高,但各造模组间无统计学差异;实验第 14 天,即给药 1 周时,半夏泻心汤组的 DAI 评分低于模型组,但差异无统计学意义;实验第 21 天,即给药 2 周时,半夏泻心汤组的 DAI 评分显著低于模型组(图 2)。由此可见,半夏泻心汤可以改善 DSS-UC 小鼠的 DAI。

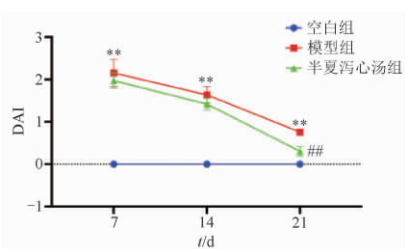


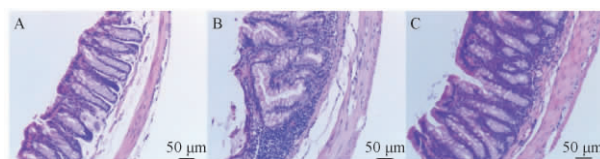
图 2 半夏泻心汤对右旋葡聚糖硫酸钠诱导的溃疡性结肠炎小鼠 DAI 的影响

Fig.2 Effects of Banxia Xiexin Decoction on DAI of mice with ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium

3.3 结肠组织病理学观察

对各组小鼠结肠远端组织进行 HE 染色,结果

显示,空白组小鼠结肠黏膜完好,肠腺排列整齐,上皮细胞正常,无明显炎症浸润;模型组肠腺排列紊乱、隐窝结构改变、上皮细胞黏液分泌减少;半夏泻心汤组结肠黏膜炎症细胞浸润减少、上皮细胞完整性改善(图 3)。由此可见,DSS-UC 小鼠模型复制成功,且半夏泻心汤可以改善 DSS-UC 小鼠局部病理改变。



A.空白组; B.模型组; C.半夏泻心汤组。

图 3 各组结肠组织病理变化(HE 染色,×200)

Fig.3 Pathological changes of colon tissue in each group (HE staining,×200)

3.4 血清炎症因子检测

ELISA 法检测小鼠血清炎症因子 IL-6 和 TNF- α 水平,结果显示,与空白组相比,模型组小鼠血清 IL-6 和 TNF- α 含量显著升高($P < 0.05$);半夏泻心汤治疗后小鼠血清 IL-6 和 TNF- α 含量则显著下降($P < 0.05$)(图 4)。由此可见,半夏泻心汤可以改善 DSS-UC 小鼠炎症因子水平,从而治疗溃疡性结肠炎。

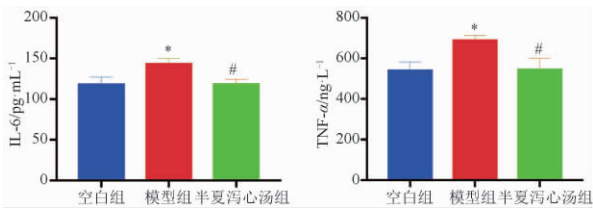


图4 各组血清 IL-6 和 TNF- α 的变化情况
Fig.4 Changes of IL-6 and TNF- α in serum of each group

3.5 肠道菌群多样性分析

对各组小鼠 9 个粪便样本采用高通量测序分析 16S rRNA 基因的 V3-V4 区,按最小样本序列数对结果进行抽平,共获得有效 OTU 50 个,分属于 94 个属、10 个门。

通过单样品的多样性分析(α 多样性)及样品间的多样性分析(β 多样性)来描述评价肠道菌群的整体结构。单样品的多样性分析以 Sobs、Ace、Chao 指数估计样品中 OTU 数目,给药组小鼠菌群丰富度有减少的趋势,但差异无统计学意义;以 Heip 指数评

估菌群的均匀性,结果显示,给药后小鼠肠道菌群较模型组小鼠均匀度更高;以 Shannon、Invsimpson 指数来估算菌群的多样性,其值越大,则说明群落多样性越高,造模后小鼠菌群的 Shannon 指数低于空白组,给药后多样性恢复;以 Coverage 指数计算各样品文库的覆盖率,本结果的 Coverage 指数值均 > 0.99,则样本序列的测出率较高(表 1);稀释曲线可验证测序数据是否可以反映样品中实际的生物多样性,并间接反映样本中物种的丰富度,结果显示随着测序数量的增加,曲线趋于平缓,表明测序深度已基本覆盖样本中所有的物种(图 5A,5B)。Venn 图显示,空白组有 333 个 OTUs,模型组有 333 个 OTUs,半夏泻心汤组有 319 个 OTUs;3 组共有的 OTU 个数为 297 个,空白组、模型组、半夏泻心汤组中分别有 8,1,3 个特有 OTUs(图 5C)。样品间差异则通过主成分分析(PCA)、主坐标分析(PCoA)及非度量多维尺度分析(NMDS)展示,结果显示,3 组样本组间重叠度小,提示 β 多样性分析结果较佳,各组间菌群结构差异明显(图 5D~5F)。

表 1 各组小鼠肠道菌群多样性分析($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 1 The gut microbiota diversity analysis of mice in each group($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	Sobs	Ace	Chao	Heip	Shannon	Invsimpson	Coverage
空白	312.667 \pm 6.429	319.226 \pm 4.297	320.345 \pm 4.774	0.118 \pm 0.013	3.630 \pm 0.124	13.688 \pm 2.020	0.999 \pm 0
模型	297.333 \pm 11.240	314.113 \pm 14.136	316.153 \pm 12.150	0.124 \pm 0.033	3.610 \pm 0.277	14.196 \pm 4.866	0.999 \pm 0
半夏泻心汤	294.333 \pm 8.083	305.923 \pm 5.126	307.534 \pm 8.993	0.170 \pm 0.029	3.919 \pm 0.143	24.915 \pm 9.835	0.999 \pm 0

3.6 肠道菌群物种注释及差异性分析

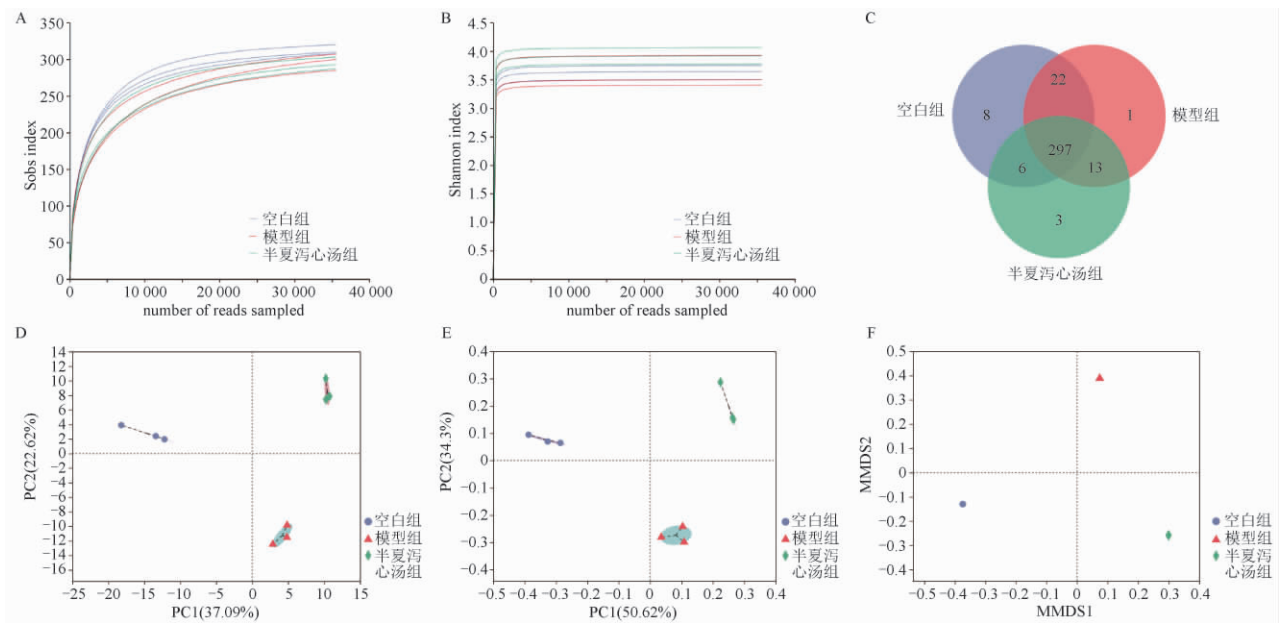
基于 16S rRNA 测序获取 OTU 的绝对丰度及注释信息,对所有样品在门水平及属水平上的序列数进行统计学分析,确定各组在门水平及属水平上的物种组成差异(表 2)。

3.6.1 空白组菌群构成 空白组菌群谱反映正常小鼠肠道菌群的构成,在门水平上, Bacteroidota (52.27%)、Firmicutes (43.63%)、Actinobacteriota (3.46%)、Patescibacteria(0.38%) 为四大主要菌类。norank_f_Muribaculaceae、Lactobacillus、Faecalibaculum、Bifidobacterium、Lachnospiraceae_NK4A136_group、unclassified_f_Lachnospiraceae 为空白组小鼠肠道菌群属水平上的主要构成。主要菌属是肠道微生态稳定的关键因素。

3.6.2 模型组菌群构成 模型组菌群谱反映 DSS-UC 小鼠肠道菌群的构成。经 2.5% DSS 诱导建立

模型后,小鼠肠道微生物结构比发生显著改变。与空白组相比,在门水平上, Patescibacteria(1.50%) 比例显著升高 ($P<0.05$), Firmicutes(51.53%) 有增加趋势, Bacteroidota(42.86%) 有减少趋势, Actinobacteriota(3.50%) 差异不大;在属水平上, Faecalibaculum($P<0.01$)、norank_f_Muribaculaceae($P<0.01$)、Lachnospiraceae_NK4A136_group($P<0.05$)、unclassified_f_Lachnospiraceae($P<0.05$) 较空白组显著减少, Turicibacter ($P<0.01$)、Romboutsia ($P<0.01$)、Clostridium_sensu_stricto_1 ($P<0.01$)、Candidatus_Saccharimonas ($P<0.05$)、Eubacterium_fissicatena_group($P<0.05$) 则显著增加。由此可见, DSS-UC 小鼠肠道菌群在构成结构上发生了变化,条件性致病菌增加,有益菌显著减少。

3.6.3 半夏泻心汤组菌群构成 该菌群谱反映的是半夏泻心汤水煎液干预 DSS-UC 小鼠 14 d 后大便



A. 稀释曲线; B. Shannon-Wiener 曲线; C. OTU 水平下的韦恩图; D. PCA 分析; E. PCoA 分析; F. NMDS 分析。

图5 肠道菌群多样性分析

Fig.5 Diversity analysis of intestinal flora

表2 小鼠菌群的相对丰度($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 The relative abundance of intestinal flora of mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

菌群	分类	空白组	模型组	半夏泻心汤组
p_Bacteroidota	门	0.522±0.006	0.427±0.072	0.478±0.020
p_Firmicutes	门	0.436±0.008	0.515±0.066	0.462±0.038
p_Actinobacteriota	门	0.035±0.008	0.035±0.007	0.042±0.014
p_Patescibacteria	门	0.004±0.002	0.015±0.005 ¹⁾	0.005±0.003 ³⁾
g_norank_f_Muribaculaceae	属	0.461±0.019	0.320±0.048 ²⁾	0.390±0.020
g_Lactobacillus	属	0.236±0.005	0.369±0.090	0.076±0.043 ⁴⁾
g_Allobaculum	属	0.011±0.011	0.001±0	0.144±0.080 ³⁾
g_Faecalibaculum	属	0.080±0.023	0.004±0.002 ²⁾	0
g_norank_f_norank_o_Clostridia_UCG-014	属	0.015±0.005	0.016±0.005	0.050±0.014 ⁴⁾
g_Alloprevotella	属	0.011±0.007	0.036±0.017	0.028±0.015
g_Bifidobacterium	属	0.026±0.005	0.018±0.004	0.030±0.007
g_Bacteroides	属	0.013±0.001	0.013±0.007	0.037±0.013 ³⁾
g_Prevotellaceae_UCG-001	属	0.016±0.011	0.034±0.024	0.007±0.004
g_Dubosiella	属	0.001±0	0.001±0	0.056±0.015 ⁴⁾
g_Lachnospiraceae_NK4A136_group	属	0.023±0.003	0.010±0.005 ¹⁾	0.017±0.003
g_unclassified_f_Lachnospiraceae	属	0.020±0.003	0.008±0.006 ¹⁾	0.014±0.002
g_Clostridium_sensu_stricto_1	属	0.002±0.002	0.030±0.011 ²⁾	0.005±0.001 ⁴⁾
g_Romboutsia	属	0	0.016±0.002 ²⁾	0.021±0.005
g_Turicibacter	属	0.002±0.001	0.015±0.001 ²⁾	0.018±0.003
g_norank_f_Lachnospiraceae	属	0.007±0.002	0.003±0.004	0.021±0.006
g_Enterorhabdus	属	0.007±0.004	0.010±0.003	0.009±0.005 ⁴⁾
g_Muribaculum	属	0.008±0.002	0.010±0.008	0.008±0.002
g_Candidatus_Saccharimonas	属	0.004±0.002	0.015±0.005 ¹⁾	0.005±0.003 ³⁾
g_Alistipes	属	0.010±0.003	0.007±0.003	0.003±0.001
g_Eubacterium_fissicatena_group	属	0	0.012±0.007 ¹⁾	0 ³⁾
g_Coriobacteriaceae_UCG-002	属	0	0.006±0.004	0.002±0.001

注: 与空白组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组相比³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

样本菌群构成。在门水平上,与模型组相比,Firmicutes(46.22%)及Patescibacteria(0.54%)丰度均有降低,且Patescibacteria丰度显著降低($P < 0.05$);Bacteroidota(47.79%)丰度有升高趋势,但仍低于空白组;药物干预后Actinobacteriota(4.15%)丰度有升高趋势。在属水平上,*Lactobacillus*($P < 0.01$)、*Clostridium_sensu_stricto_1*($P < 0.01$)、*Enterorhabdus*($P < 0.01$)、*Candidatus_Saccharimonas*($P < 0.05$)、*Eubacterium_fissicatena_group*($P < 0.05$)显著减少,而*Dubosiella*($P < 0.01$)、*Bacteroides*($P < 0.05$)、*Allobaculum*($P < 0.05$)则显著增加。因此,半夏泻心汤可显著降低因DSS诱导所致的肠道致病菌增加并可提升有益菌相对丰度。

3.6.4 LefSe 分析 为了筛选各组别间具有显著差异的菌群,采用新型的元基因组学分析方法 LefSe (linear discriminate analysis size effect) 分析。LefSe

分析是一种在基因与细菌学领域用于寻找高维生物标志、揭示基因组特征的统计学方法。LefSe 分析将线性判别分析与非参数检验相结合,可以识别多种生物标志物,实现多组别之间的比较。本研究以 $LDA > 3.5$ 为筛选标准,用于检验菌群丰富度。空白组在 p_unclassified_k_norank_d_Bacteria、c_unclassified_p_Firmicutes、o_Oscillospirales、f_Muribaculaceae、g_Faecalibaculum、g_GCA_900066575、g_Blautia 丰度较高;模型组丰度最高的有 o_Lactobacillales、o_Clostridiales、o_Pseudomonadales、o_unclassified_c_Bacilli、f_Atopobiaceae、g_unclassified_f_Oscillospiraceae、g_Eubacterium_fissicatena_group;半夏泻心汤组丰度具有显著差异的是 p_Verrucomicrobiota、p_Desulfobacterota、o_Erysipelotrichales、o_Peptostreptococcales_Tissierellales、g_Lachnospiraceae_UCG_001、g_Butyricimonas(图6、7)。

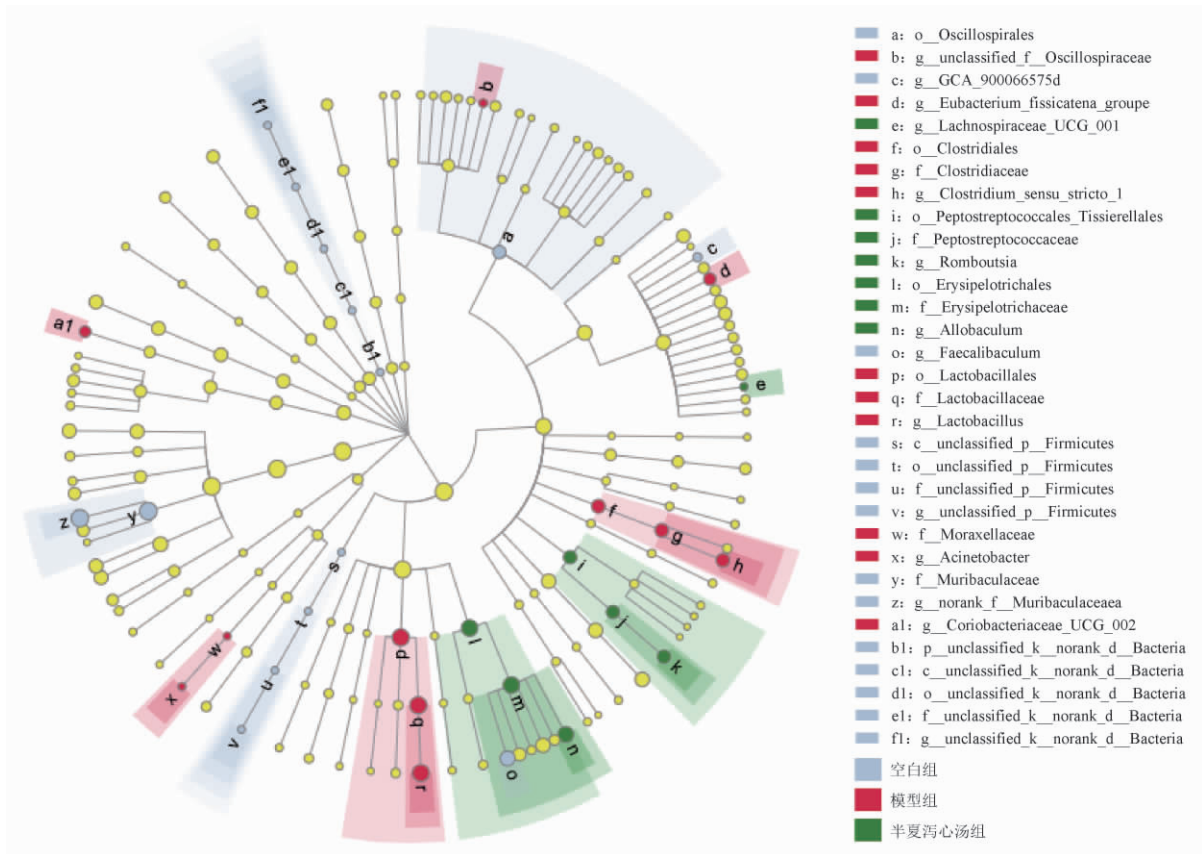


图6 各组优势菌群的差异

Fig.6 Difference in dominant microorganisms between groups

4 讨论

半夏泻心汤出自仲景《伤寒论》,原方用于治疗

小柴胡汤证误下而致的心下痞症。随着近年来研究的不断深入,半夏泻心汤被广泛应用于临床各科多

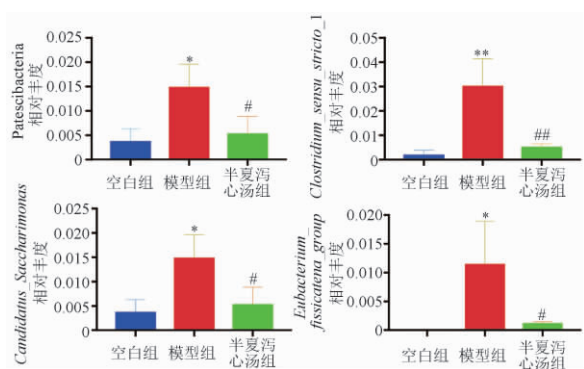


图7 半夏泻心汤对肠道菌群相对丰度的影响

Fig.7 Effects of Banxia Xiexin Decoction on relative abundance of gut microbial

种疾病的治疗,尤其广泛应用于消化系统疾病如胃炎^[36-37]、结肠炎^[27,38]等疾病,临床收效较好。研究表明半夏泻心汤治疗 UC 可显著缓解患者临床症状、缩短病程、降低复发率^[27,39]。课题组前期研究发现半夏泻心汤可通过降低 Th1 细胞因子,升高 Th2 细胞因子,综合调控 UC 小鼠免疫微环境,恢复 Th1/Th2 免疫平衡稳态,从而促使炎症改善,达到治疗 UC 的目的^[40]。越来越多的研究显示,UC 的发生发展与肠道菌群的失调密切相关;同时半夏泻心汤亦与肠道菌群有密切的联系,其主要的活性物质可通过调节菌群来发挥治疗作用。但未有研究从肠道菌群的角度探讨半夏泻心汤治疗 UC 的机制,半夏泻心汤是否可以通过调节肠道菌群发挥治疗 UC 的作用,目前尚不明确。因此设计本研究探讨半夏泻心汤对 DSS-UC 小鼠的疗效及肠道菌群的差异。

本研究采用 2.5% DSS 溶液自由饮用 7 d 诱导建立 UC 小鼠模型,通过对各组小鼠一般情况、DAI、病理结果及炎症因子变化情况判定模型建立是否成功以及半夏泻心汤疗效。隐窝结构改变(隐窝分支、萎缩等)为 UC 特征性病理特征,本研究结果显示,模型组小鼠结肠组织含有大量炎症细胞、腺体排列不规则,隐窝分支;经半夏泻心汤干预后显著恢复。UC 是一种 Th1 分泌亢进的疾病^[41],而 IL-6 和 TNF- α 由 Th1 免疫细胞分泌,介导细胞免疫。本研究结果显示,模型组小鼠血清 IL-6 和 TNF- α 含量显著升高,经半夏泻心汤干预后明显降低。上述研究结果表明,采用 2.5% DSS 溶液自由饮用 7 d 构建的 UC 小鼠模型复制成功,给药后小鼠各症状指标明显缓解,此证明半夏泻心汤干预 DSS-UC 小鼠模型确

有疗效。

菌群结构 Bar 图直观展示了各微生物的种类及相对丰度。在各组别中 Bacteroidota 和 Firmicutes 是门水平上的主要菌群,占有所有菌群的 90% 以上;其次为 Actinobacteriota 和 Patescibacteria,此结果与余今菁、李云等^[42-43]的研究结果相一致。Firmicutes 下的 *Clostridium* 和 *Eubacterium* 均为厌氧菌,*Lactobacillus* 为兼性厌氧菌,故在 DSS 诱导建模后此类菌属相对丰度升高,经 BXD 治疗后显著下降。推断造成此结果的原因为建模后肠道氧环境破坏,含氧量下降^[44-45],*Clostridium*、*Eubacterium*、*Lactobacillus* 等厌氧菌和兼性厌氧菌在无氧环境中大量繁殖;而经半夏泻心汤治疗后,SOD 活性增强,清除过量的氧自由基,减少脂质氧化作用,提高肠道氧含量^[40,46-47],使致病性厌氧菌 *Clostridium* 和 *Eubacterium* 丰度降低,*Lactobacillus* 虽属于有益菌,但因其厌氧特性,在半夏泻心汤干预后改善肠道氧环境而致使其丰度下降。*Bacteroidota* 可通过减少多糖 A 促进的 T 调节细胞分化来干预 Th1/Th2 免疫平衡,在 UC 疾病状态下,其丰度下降而致免疫力降低^[48],DSS-UC 小鼠经半夏泻心汤干预后,其中的 *Bacteroides* 丰度升高。DSS 干预后的小鼠肠道菌群中 *Bifidobacterium* 丰度具有下降趋势,BXD 干预后则有恢复趋势,且 *Bifidobacterium* 可增强肠道防御能力,具有免疫调节作用,是常见的益生菌^[49],是 UC 微生物治疗的常用菌之一^[50]。由此可见半夏泻心汤可有效促进益生菌的增殖,抑制条件致病菌的生长,改善肠道微生态结构,从而发挥治疗 UC 的作用。

近年来微生物制剂及菌群移植疗法^[51-52]在 UC 的治疗中备受关注,但因目前菌种有限,并无法完全恢复 UC 患者的正常肠道微生态,而 BXD 可在一定程度上改善 UC 所致的肠道菌群紊乱,故此提示,可将 BXD 与微生物制剂联合应用,以期为 UC 的临床用药提供新的思路。

BXD 可以显著改善 DSS-UC 小鼠症状,降低 IL-6 和 TNF- α ;并可显著降低条件性致病菌 *Clostridium_sensu_stricto_1*、*Candidatus_Saccharimonas*、*Eubacterium_fissicatena_group* 的丰富度,提高有益菌 *Bacteroides*、*Bifidobacterium* 的相对丰度,提示 BXD 可能通过改善肠道微生态结构组成从而达到治疗 UC 的作用。

[参考文献]

- [1] KO C W, SINGH S, FEUERSTEIN J D, et al. AGA clinical practice guidelines on the management of mild-to-moderate ulcerative colitis [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(3): 748.
- [2] NG S C, SHI H Y, HAMIDI N, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies [J]. *Lancet*, 2018, 390(10114): 2769.
- [3] 姚燕琴,孙文浩,朱行睿,等.中药多途径治疗溃疡性结肠炎的疗效及对炎症因子的影响[J].*中国现代应用药学*,2019,36(13):1692.
- [4] RUBIN D T, ANANTHAKRISHNAN A N, SIEGEL C A, et al. ACG clinical guideline: ulcerative colitis in adults [J]. *Am J Gastroenterol*, 2019, 114(3): 384.
- [5] ZHANG S, SHEN H, ZHENG K, et al. Expert consensus on TCM diagnosis and treatment of ulcerative colitis (2017) [J]. *China J Trad Chin Med Pharm*, 2017, 32(8): 3585.
- [6] OLÉN O, ERICHSEN R, SACHS M C, et al. Colorectal cancer in ulcerative colitis: a Scandinavian population-based cohort study [J]. *Lancet*, 2020, 395(10218): 123.
- [7] FISHER R C, BELLAMKONDA K, ALEX MOLINA L, et al. Disrupting inflammation-associated CXCL8-CXCR1 signaling inhibits tumorigenicity initiated by sporadic and colitis-colon cancer stem cells [J]. *Neoplasia*, 2019, 21(3): 269.
- [8] 吴东升,曹晖,张彧,等.中医药干预溃疡性结肠炎 Th17/Treg 平衡的研究进展[J].*中国实验方剂学杂志*,2019,25(16):213.
- [9] PUNKENBURG E, VOGLER T, BÜTTNER M, et al. Batf-dependent Th17 cells critically regulate IL-23 driven colitis-associated colon cancer [J]. *Gut*, 2016, 65(7): 1139.
- [10] SHI C, YANG Y, XIA Y, et al. Novel evidence for an oncogenic role of microRNA-21 in colitis-associated colorectal cancer [J]. *Gut*, 2016, 65(9): 1470.
- [11] KAU A L, AHERN P P, GRIFFIN N W, et al. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system [J]. *Nature*, 2011, 474(7351): 327.
- [12] SENDER R, FUCHS S, MILO R. Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans [J]. *Cell*, 2016, 164(3): 337.
- [13] ZHU B, WANG X, LI L. Human gut microbiome: the second genome of human body [J]. *Protein Cell*, 2010, 1(8): 718.
- [14] JANDHYALA S M, TALUKDAR R, SUBRAMANYAM C, et al. Role of the normal gut microbiota [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(29): 8787.
- [15] WITKOWSKI M, WEEKS T L, HAZEN S L. Gut microbiota and cardiovascular disease [J]. *Circ Res*, 2020, 127(4): 553.
- [16] LO SASSO G, KHACHATRYAN L, KONDYLIS A, et al. Inflammatory bowel disease-associated changes in the gut: focus on kazán patients [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2020, doi: 10.1093/ibd/izaa188.
- [17] RATAJCZAK A E, SZYMCZAK-TOMCZAK A, SKRZYPCZAK-ZIELISKA M, et al. Vitamin C deficiency and the risk of osteoporosis in patients with an inflammatory bowel disease [J]. *Nutrients*, 2020, doi: 10.3390/nu12082263.
- [18] LI R, HUANG X, LIANG X, et al. Integrated omics analysis reveals the alteration of gut microbe-metabolites in obese adults [J]. *Brief Bioinform*, 2020, doi: 10.1093/bib/bbaa165.
- [19] CHOI B S, DAOUST L, PILON G, et al. Potential therapeutic applications of the gut microbiome in obesity: from brain function to body detoxification [J]. *Int J Obes (Lond)*, 2020, doi: 10.1038/s41366-020-0618-3.
- [20] BIASSONI R, DI MARCO E, SQUILLARIO M, et al. Gut microbiota in T1DM-onset pediatric patients: machine-learning algorithms to classify microorganisms as disease linked [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2020, doi: 10.1210/clinem/dgaa407.
- [21] 陈阳,陆杰,朱思敏,等.基于高通量测序技术研究葛根芩连汤及其配伍对急性肠炎大鼠肠道菌群多样性的影响[J].*中国中药杂志*,2020,45(6):1406.
- [22] 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.
- [23] 李醒,褚夫江,蒋诗林,等.桑黄乙醇提取物对大鼠尿酸代谢及肠道微生物影响的初步研究[J].*中国中药杂志*,2021,46(1):177.
- [24] 刘立萍,李然,姜楠,等.基于肠道菌群探讨苓桂术甘汤对瘦素缺陷代谢紊乱模型小鼠的骨保护作用[J].*中国实验方剂学杂志*,2019,25(20):19.
- [25] 王佳丽,修成奎,杨静,等.人参三七川芎提取物对高糖高脂诱导血管衰老小鼠肠道菌群的影响[J].*中国中药杂志*,2020,45(12):2938.
- [26] YU Y, ZHANG G, HAN T, et al. Analysis of the pharmacological mechanism of Banxia Xiexin decoction in treating depression and ulcerative colitis based on a biological network module [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, doi: 10.1186/s12906-020-02988-3.
- [27] 司马彦.柳氮磺吡啶配合半夏泻心汤治疗溃疡性结肠炎50例疗效观察[J].*中国肛肠病杂志*,2020,40(1):32.
- [28] 朱建斌,杜锦辉,关敬之,等.以半夏泻心汤为基础方随证加减治疗溃疡性结肠炎临床随机对照试验 Meta 分析[J].*辽宁中医药大学学报*,2016,18(12):10.
- [29] 胡传文,江红娟,郑小春,等.半夏泻心汤结合保留灌肠治疗缓解期溃疡性结肠炎及对肠道内菌群水平的影响[J].*新中医*,2020,52(3):10.
- [30] 裴强伟,孙志翠,宋小莉,等.半夏泻心汤及其加减方治疗溃疡性结肠炎疗效和安全性的系统评价[J].*中国实验方剂学杂志*,2012,18(14):290.
- [31] 覃高,刘春强.半夏泻心汤加减配合中药保留灌肠治疗溃疡性结肠炎疗效观察[J].*智慧健康*,2020,6(13):147.
- [32] 沈照峰,吴红辉,朱磊,等.基于 PRIO-harms 的中医药治疗溃疡性结肠炎系统评价再评价[J].*中国中药杂志*,2020,45(3):674.

- [33] 孙志其, 韩涛, 黄海量. 半夏泻心汤原方药物用量及半夏炮制方法考探 [J]. 山东中医药大学学报, 2020, 44(2): 130.
- [34] FAN L, ZUO S, TAN H, et al. Preventive effects of pectin with various degrees of esterification on ulcerative colitis in mice [J]. Food Funct, 2020, 11(4): 2886.
- [35] LUKAS M, MALICKOVA K, KOLAR M, et al. Switching from originator adalimumab to the biosimilar SB5 in patients with inflammatory bowel disease: short-term experience from a single tertiary clinical centre [J]. J Crohns Colitis, 2020, 14(7): 915.
- [36] 姚腾飞. 半夏泻心汤加减治疗慢性浅表性胃炎的疗效研究 [J]. 中国继续医学教育, 2020, 12(22): 169.
- [37] 许秀芬, 罗荣山, 袁媛, 等. 半夏泻心汤治疗 Hp 阳性慢性萎缩性胃炎效果观察 [J]. 内蒙古中医药, 2020, 39(4): 42.
- [38] 张效岩. 半夏泻心汤治疗慢性结肠炎 55 例疗效观察 [J]. 中国肛肠病杂志, 2019, 39(4): 28.
- [39] 张莉萍. 半夏泻心汤加减治疗溃疡性结肠炎 64 例临床观察讨论 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(80): 157.
- [40] 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]. 济南: 山东中医药大学, 2015.
- [41] 张少华. 溃疡性结肠炎患者 Th17 和 Th1/Th2 细胞亚群的研究 [J]. 中国热带医学, 2011, 11(1): 86.
- [42] 余今菁, 李欢, 胡邱宇, 等. 基于高通量测序技术的溃疡性结肠炎患者肠道菌群多样性研究 [J]. 华中科技大学学报(医学版), 2018, 47(4): 460.
- [43] 李云, 戴岳, 夏玉凤. 溃疡性结肠炎内源性代谢物和肠道菌群变化研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2017, 31(9): 907.
- [44] KANG J E, KIM H D, PARK S Y, et al. Dietary supplementation with a bacillus superoxide dismutase protects against γ -radiation-induced oxidative stress and ameliorates dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis in mice [J]. J Crohns Colitis, 2018, 12(7): 860.
- [45] LIU B, PIAO X, NIU W, et al. Kuijieyuan Decoction improved intestinal barrier injury of ulcerative colitis by affecting TLR4-dependent PI3K/AKT/NF- κ B oxidative and inflammatory signaling and gut microbiota [J]. Front Pharmacol, 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.01036.
- [46] SHUAI Y, YINZI Y, JINBANG W, et al. Banxia Xiexin decoction, a traditional Chinese medicine, alleviates colon cancer in nude mice [J]. Ann Transl Med, 2019, 7(16): 375.
- [47] 周云, 徐彤, 杨百京, 等. 半夏泻心汤加减治疗脾胃湿热型慢性浅表性胃炎临床观察 [J]. 光明中医, 2019, 34(18): 2754.
- [48] 徐晓玲, 柴海娜, 孙超, 等. 扬州市初诊为溃疡性结肠炎患者的肠道菌群变化及意义 [J]. 国际消化病杂志, 2017, 37(2): 117.
- [49] SOMMER F, RÜHLEMANN M C, BANG C, et al. Microbiomarkers in inflammatory bowel diseases: caveats come with caviar [J]. Gut, 2017, 66(10): 1734.
- [50] SAEZ-LARA M J, GOMEZ-LLORENTE C, PLAZA-DIAZ J, et al. The role of probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria in the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and other related diseases: a systematic review of randomized human clinical trials [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 505878.
- [51] LEONARDI I, PARAMSOTHY S, DORON I, et al. Fungal trans-kingdom dynamics linked to responsiveness to fecal microbiota transplantation (FMT) therapy in ulcerative colitis [J]. Cell Host Microbe, 2020, 27(5): 823.
- [52] SOOD A, SINGH A, MAHAJAN R, et al. Clinical predictors of response to faecal microbiota transplantation in patients with active ulcerative colitis [J]. J Crohns Colitis, 2020, doi: 10.1093/ecco-jcc/jjaa163.

[责任编辑 马超一]