

### 3种止泻名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

马旭冉<sup>1</sup>, 王彦礼<sup>1</sup>, 邹迪新<sup>1</sup>, 刘佳星<sup>1</sup>, 宋红新<sup>1</sup>, 杨伟鹏<sup>1\*</sup>, 李 彧<sup>2\*</sup>

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

**摘要:** 对比研究黄芩汤、四神丸、痛泻要方3种止泻名方对大鼠溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 细胞因子表达与肠道菌群变化的影响。经中国中医科学院中药研究所伦理委员会审议同意并批准后, 以2,4,6-三硝基苯磺酸 (2,4,6-trinitrobenzenesulfonic, TNBS) 复合造模法制备UC大鼠模型, 按体重随机分为正常组、模型组、阳性药柳氮磺胺吡啶组 (sulfasalazine, SASP, 0.5g·kg<sup>-1</sup>)、黄芩汤组 (HQT, 20g·kg<sup>-1</sup>)、四神丸组 (SSW, 26g·kg<sup>-1</sup>) 和痛泻要方组 (TXYF, 22g·kg<sup>-1</sup>)。连续给药7天后, 取大鼠粪便并眼眶取血后处死, 再取结肠, HE染色法检测大鼠结肠组织病变损伤程度, 酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 测定血清中肿瘤坏死因子 $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素6 (interleukin-6, IL-6)、白细胞介素8 (interleukin-8, IL-8) 和前列腺素E<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>) 含量, 提取粪便样品总DNA, 于16SMiseqPE300V3-4区段进行高通量测序并分析。细胞因子结果表明, 与模型组相比, 阳性药SASP组的IL-6、PGE<sub>2</sub>、TNF- $\alpha$ 含量均降低 ( $P<0.05$ ), IL-8水平降低最为显著 ( $P<0.01$ ); HQT组IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 含量均降低 ( $P<0.05$ ), PGE<sub>2</sub>含量显著降低 ( $P<0.01$ ); SSW组4种炎性因子含量均降低, 但无统计学差异; TXYF组IL-6、TNF- $\alpha$ 含量降低, IL-8、PGE<sub>2</sub>含量明显降低 ( $P<0.05$ )。对肠道菌群测序后的结果显示, 在样本微生物信息数据量足够充分的情况下, 物种丰度: SSW组>HQT组>TXYF组; 样本间相似性: TXYF组>SSW组>HQT组; 与模型组相比, HQT组和TXYF组菌群种类差异较大, 肠内有益菌含量: HQT组>SSW组>TXYF组。3种名方对大鼠溃疡性结肠炎均有一定治疗作用, 可有效改善UC大鼠的体征及精神状况, 但在抑制炎性因子IL-6、IL-8、PGE<sub>2</sub>、TNF- $\alpha$ 及调节肠道微生态方面, HQT的治疗作用优于SSW和TXYF。

**关键词:** 方证对应; 溃疡性结肠炎; 炎性细胞因子; 肠道菌群; 高通量测序

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)07-1241-10

### Comparison of intestinal bacteria and inflammatory cytokine expression in rats with ulcerative colitis after treatment of three regiments

MA Xu-ran<sup>1</sup>, WANG Yan-li<sup>1</sup>, ZOU Di-xin<sup>1</sup>, LIU Jia-xing<sup>1</sup>, SONG Hong-xin<sup>1</sup>, YANG Wei-peng<sup>1\*</sup>, LI Yu<sup>2\*</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**Abstract:** This study was designed to compare intestinal bacteria and inflammatory cytokine expression in rats with ulcerative colitis (UC) after treatment of three regiments, Huang-qin-tang (HQT), Si-shen-wan (SSW), and Tong-xie-yao-fang (TXYF). After approved by Institute of Chinese Materia Medica Ethics Committees in China Academy of Chinese Medical Sciences, UC in rats was induced by using a compound method (trinitrobenzenesulfonic acid plus ethanol). Rats were randomly divided into control, disease, positive control salazosulfapyridine

收稿日期: 2019-01-14; 修回日期: 2019-04-23.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81273662, 81473592); 国家重大新药创制专项资助项目 (2014ZX09304306-006).

\*通讯作者 Tel: 86-10-64093014, E-mail: hrbywp@sina.com;

Tel: 86-10-64286374, E-mail: liyubeijing1973@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0051

(SASP,  $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), HQT ( $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), SSW ( $26 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), and TXYF groups ( $22 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). After 7 days of treatment, colonic tissues and the blood were taken for various assays. Damage of colonic tissues was detected by H&E staining. The levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and prostaglandin  $E_2$  (PGE $_2$ ) in the serum were detected by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Total DNA was extracted from stool samples for analyses of 16SMiseqPE300V3-4 segment using high-throughput sequencing. The inflammatory cytokine results showed that compared with the disease group, the content of IL-6, PGE $_2$ , TNF- $\alpha$  in SASP group were decreased ( $P < 0.05$ ), with the most significant decrease being the level of IL-8 ( $P < 0.01$ ), whereas the levels of IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$  in HQT group were reduced ( $P < 0.05$ ) and PGE $_2$  content was clearly reduced ( $P < 0.01$ ). The contents of four cytokines in SSW group were decreased, but there was no statistical difference. While the levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  in TXYF group were reduced, and the reductions of IL-8 and PGE $_2$  were significant ( $P < 0.05$ ). The results after sequencing showed that microbiome species richness SSW group > HQT group > TXYF group; the similarity between samples TXYF group > SSW group > HQT group; the species of HQT and TXYF group have greater difference when compared to the disease group. The content of beneficial bacteria in the intestine of HQT group > SSW group > TXYF group. Three regimens all have therapeutic effects on UC, manifested by improvements of the signs and mental status of UC rats. However, in terms of inhibition of inflammatory factors IL-6, IL-8, PGE $_2$  and TNF- $\alpha$ , and regulation of intestinal microbiome, the therapeutic effect of HQT was superior than SSW and TXYF.

**Key words:** correspondence of prescription and syndrome; ulcerative colitis; inflammatory cytokine; intestinal microbiome; high-throughput sequencing

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种常见的慢性非特异性炎症性肠病, 发病机制涉及微生物群改变、免疫应答失调、肠道上皮障碍缺陷、遗传易感性和环境因素等。临床消化系统症状表现为腹痛、腹泻、黏液脓血便和胃肠痉挛, 同时伴随食欲降低、发热等全身症状, 病情轻重不一, 病程迁延难愈, 目前临床主要以控制急性发作、缓解并诱导加快肠黏膜愈合、减少复发、降低并发症、改善患者生活质量为治疗目的<sup>[1]</sup>。近年来研究表明, 临床用于治疗溃疡性结肠炎的名方主要有黄芩汤 (HQT)、四神丸 (SSW) 和痛泻要方 (TXYF), HQT 出自《伤寒论》, 主治热泄热痢的湿热型泻泄, 即邪滞蕴结、肠胃之气不宣导致的脓血稠粘型泻泄, 功效清热止痢、和中止痛<sup>[2]</sup>; SSW 最早见于《内科摘要》, 用于脾肾阳虚之肾泄, 为治命门火衰、火不暖土所致五更泄泻或久泻的常用方, 温肾暖脾、固肠止泻<sup>[3]</sup>; TXYF 载于《丹溪心法》, 主治脾虚肝旺之痛泻, 多用于土虚木乘、肝脾不和、脾运失常所致泻泄, 可补脾柔肝、祛湿止泻<sup>[4]</sup>。为探讨 3 种名方治疗 UC 的作用机制异同, 体现中医辨证论治及方证对应思想的合理性, 本实验从抑制炎症和肠道菌群变化的角度入手, 对 3 种名方的作用机制进行对比研究。

## 材料与方

**动物** SPF 级雄性 SD 大鼠, 体重 180~200 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 许可证号: SCXK (京) 2016-0006。饲养于清洁级动物房, 温度为

( $23 \pm 1.5$ ) °C, 相对湿度为 ( $45 \pm 15$ ) %。实验方案经中国中医科学院中药研究所伦理委员会审议同意并批准。

**药品与试剂** 黄芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi)、芍药 (*Paeonia lactiflora* Pall)、炙甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch)、大枣 (*Ziziphus jujuba* Mill)、补骨脂 (*Psoralea corylifolia* Linn)、肉豆蔻 (*Myristica fragrans* Houtt)、五味子 (*Schisandra chinensis*)、白术 (*Atractylodes macrocephala* Koidz)、陈皮 (*Citrus reticulata* Blanco)、防风 (*Saposhnikovia divaricata* Schischk) 均购自北京华邈药业有限公司, 吴茱萸 (*Evodia rutaecarpa* Benth) 购自北京仟草中药饮片有限公司, 以上药材经鉴定为合格药材。HQT、SSW 和 TXYF 水提物均依照文献方法制得<sup>[5-7]</sup>。2,4,6-三硝基苯磺酸 (TNBS, 美国 Sigma 公司); 柳氮磺胺吡啶肠溶片 (salazosulfapyridine, SASP, 批号: 09170726, 上海信谊天平药业有限公司); 白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒 (货号: EK0412, 武汉博士德生物工程有限公司); 肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 8 (interleukin-8, IL-8) 和前列腺素  $E_2$  (prostaglandin  $E_2$ , PGE $_2$ ) ELISA 试剂盒 (货号分别为 D730561、D730509 和 D730457, 上海生工生物工程有限公司); MoBio PowerSoil DNA Isolation Kit (Qiagen 公司); 2×Taq PCR MasterMix (含绿染料, Biomed 公司); Agencourt® AMPure® XP 核酸纯化试剂盒 (Beckman Coulter 公司); NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit (NEB 公司); Agilent DNA 1000

Kit (Agilent 公司); HT DNA-Extended Range LabChip (PerkinElmer 公司); KAPA Library Quantification Kit 文库定量试剂盒 (KAPA 公司); Miseq® Reagent Kit v3 (PE300)、Miseq Reagent Kit v2 (Illumina 公司)。

**造模** 采用 Morris 等<sup>[8]</sup>报道的方法制备大鼠 UC 模型, 适应性饲养后禁食不禁水 24 h, 大鼠用 20% 乌拉坦 ( $0.05 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 麻醉后一次性将 TNBS 混合溶剂 (TNBS  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ +50% 乙醇 0.25 mL) 注入大鼠肛门上方约 8 cm 处, 捏紧肛门, 倒置 5 min。正常组给予相等体积的 85% 生理盐水, 造模后 2 h 左右大鼠恢复意识, 开始自由活动, 术后常规饲养。

**实验分组及样品采集** 大鼠按体重随机分为正常组、模型组、阳性药 SASP 组、HQT 组、SSW 组、TXYP 组, 每组 10 只。造模 3 天后开始灌胃给药, 给药剂量按临床成人用量 10 倍折算, 阳性药 SASP 为  $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , HQT、SSW、TXYP 分别为 20、26 和  $22 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 正常组和模型组灌胃以同等体积的生理盐水, 每日 1 次, 连续 7 天。末次给药后大鼠禁食不禁水 24 h, 收集大鼠粪便, 放入冻存管内  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  备用。对各组大鼠进行眼眶取血,  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min, 分离上层血清,  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。取血后处死大鼠, 取距肛门 8 cm 处结肠组织, 沿肠系膜边缘仔细剪开肠腔, 用预冷的生理盐水冲洗肠道内容物, 洗涤完毕后剪为两段, 一段冻存于  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 另一段置于 10% 多聚甲醛中固定, 进行常规病理切片及染色。

**行为学检测** 分别观察大鼠造模前后及给药期间的生理及精神状态, 记录体重。

**病理学检测** 肉眼及镜下观察结肠组织形态, 按常规步骤进行包埋、切片, 切片厚度为  $4 \mu\text{m}$ , 随即进行 HE 染色, 高倍镜下选取视野, 根据溃疡大小、炎症浸润情况及内部结构损伤程度等进行结肠组织病变损伤程度统计和比较。

**细胞因子检测** 每组随机选取 7 份血清样本, 运用 ELISA 法测定血清中 IL-6、IL-8、 $\text{PGE}_2$  及  $\text{TNF-}\alpha$  含量。

**肠道菌群检测** 基因 DNA 的提取: 每组随机选取 7 份粪便样品, 将样品在冰上融化后, 离心并充分混匀, Nanodrop 检测样品质量, 取 30 ng 进行 PCR 扩增。PCR 扩增: 依照制定测序区域, 合成带有 barcode 的特异性引物或合成带有错位碱基的融合引物, 为保证后续数据分析的准确性与可靠性, 需满足①尽可能使用低循环数扩增; ②保证每个样本扩增的循环数一致。随机选取具有代表性的样本来进行预实验, 确保在最低循环数中能使绝大多数样本扩增出浓度合适的产物。琼脂糖凝胶电泳检测参数为: 胶浓度 1%; 电压

170 V; 电泳时间 30 min。PCR 扩增体系、扩增引物序列、PCR 扩增程序见表 1。

**Table 1** PCR amplification system, amplified primer sequence and PCR amplification program. BSA: Bovine serum albumin

Reagent component	Volume
DNA sample	30 ng
Forward primer ( $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	1 $\mu\text{L}$
Reverse primer ( $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	1 $\mu\text{L}$
BSA ( $2 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	3 $\mu\text{L}$
2×Taq Plus Master Mix	12.5 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	7.5 $\mu\text{L}$
Total	25 $\mu\text{L}$
Amplification area	Primer sequence
16SV3-V4	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG GGACTACHVGGGTWTCTAAT
Temperature	Time
94 $^{\circ}\text{C}$	5 min
94 $^{\circ}\text{C}$	30 s
55 $^{\circ}\text{C}$	30 s
72 $^{\circ}\text{C}$	60 s
72 $^{\circ}\text{C}$	7 min
4 $^{\circ}\text{C}$	End

基础质控分析: Shannon-Wiener<sup>[9]</sup>是反映样本中微生物多样性的指数, 利用各样本的测序量在不同测序深度时的微生物多样性指数来构建曲线, 以此反映各样本在不同测序数量时的微生物多样性。Rank-Abundance 曲线用来解释多样性的物种丰度和物种均匀度<sup>[10]</sup>。

Alpha 多样性分析: 可以反映微生物群落的丰度和多样性, 各指数算法如下<sup>[11]</sup>: Chao1: 即菌种丰富度指数, 用以估计群落中的 OTU 数目。公式为  $\text{Schao1} = \text{Sobs} + n1(n1-1)/(n2+1)$ 。其中 Schao1 为估计的 OTU 数, Sobs 为观测到的 OTU 数, n1 为只有一条序列的 OTU 数目, n2 为只有两条序列的 OTU 数目。Observed-species: 随测序深度的增加, 实际观测到 OTU 的个数。Goods-coverage: 观测深度,  $C=1-n1/N$ 。n1 为只有含一条序列的 OTU 数目, N 为抽样中出现的总序列数目。该指数反映本次测序结果是否代表了样本中微生物的真实情况。

OTU 聚类分析: 使用统计学的分析方法来观测样本在不同分类水平上的群落结构, 同时将多个样本的群落结构分析放在一起。

Beta 多样性分析: 主成分分析 (principal component analysis, PCA)<sup>[12]</sup>可以有效地找出数据中最“主要”的元素和结构, 通过分析不同样本 OTU (97% 相似性) 组成可以反映样本间的差异和距离, 揭示隐藏在复杂数据背后的简单结构。PCA 运用方差分解, 将多组数据的差异反映在二维坐标图上, 坐标轴取能够最大反映方

差值的两个特征值,若样本组成越相似,反映在PCA图中的距离越近,不同环境间的样本可能表现出分散和聚集的分布情况,PCA结果中对样本差异性解释度最高的两个成分可以用于对假设因素进行验证。

LefSe分析: LDA Effect Size分析<sup>[12]</sup>可以实现多个分组之间的比较并进行内部亚组比较分析,从而找到组间在丰度上有显著差异的物种(即biomarker)。

统计学方法 实验数据用SPSS20.0统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 $t$ 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异极具统计学意义。

## 结果

### 1 3种复方对溃疡性结肠炎大鼠行为学表现的影响

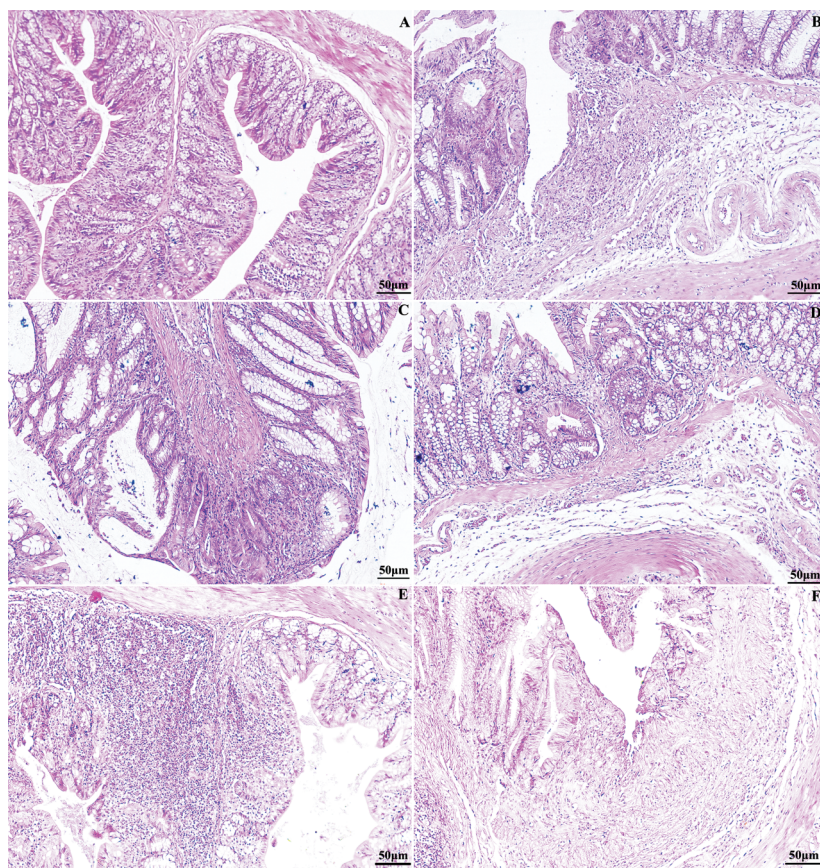
TNBS复合造模后的大鼠在3天内出现黏液便,少数出现脓血便,粪便黏连带恶臭,大鼠精神萎靡、双目暗淡、喜扎堆、毛发无光且凌乱、体重降低、饮食不振。给药7天后,阳性药SASP组、HQT组、SSW组便溏症状明显改善,TXYF组仍无成形便,模型组症状未出现显著改善。

### 2 病理学指标

各组大鼠结肠组织HE染色如图1所示。

结肠组织肉眼观察结果:正常组结肠外观正常,未见黏连及充血,结肠内外各层面未见明显病变;模型组部分结肠充血严重,肠黏膜颜色加深伴节段性黏连,未成形粪便充满肠道未排除,伴有恶臭;阳性药SASP组结肠表层偶有血丝,未见明显充血;HQT组结肠部分充血,成形粪便节段性充满肠道;SSW组结肠水肿伴充血;TXYF组结肠有微小瘀血伴水肿。与模型组相比,HQT组、SSW组和TXYF组病变均明显减轻。

结肠组织镜下观察结果:正常组结肠组织黏膜纹理清晰,结构完整,腺体排列整齐,无炎症细胞浸润;模型组结肠损伤严重,表现为多处溃疡,并且溃疡较深,达到肌层组织,腺体坏死、萎缩,黏膜层、黏膜下层、肌层等有大量炎症细胞如中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞等浸润;阳性药SASP组结肠组织可见溃疡形成,部分区域见黏膜腺体结构破坏,少量炎症细胞浸润;HQT组结肠组织见多处表浅溃疡形成,损伤处有少量炎症细胞浸润;SSW组结肠组织偶见溃疡形成,部分黏膜腺体脱落;TXYF组结肠组织表浅处有黏膜腺体损伤。



**Figure 1** Microscopic damage of colon tissue of rats (10×40). Effects of three compound on colon tissue damage of rats. A: Normal group; B: Model group; C: Salazosulfapyridine (SASP, 0.5 g·kg<sup>-1</sup>) group; D: Huang-qin-tang (HQT, 20 g·kg<sup>-1</sup>) group; E: Si-shen-wan (SSW, 26 g·kg<sup>-1</sup>) group; F: Tong-xie-yao-fang (TXYF, 22 g·kg<sup>-1</sup>) group

与模型组相比, SASP组大鼠结肠黏膜炎性浸润、腺体溃疡等病变情况明显减轻, HQT组、SSW组和TXYF组的病变程度均有不同程度减轻, HQT改善程度最为显著, TXYF组改善程度不明显。

### 3 3种复方对溃疡性结肠炎大鼠血清中炎症细胞因子的影响

将3种复方分别连续给予UC模型大鼠7天后, 血清中IL-6、IL-8、PGE<sub>2</sub>和TNF- $\alpha$ 含量如图2所示。模型组血清中炎症因子IL-8、PGE<sub>2</sub>、TNF- $\alpha$ 含量均高于正常组 ( $P<0.05$ ), IL-6含量显著升高 ( $P<0.01$ )。与模型组相比, 阳性药SASP组的IL-6、PGE<sub>2</sub>、TNF- $\alpha$ 含量均降低 ( $P<0.05$ ), IL-8水平降低最为显著 ( $P<0.01$ ); HQT组IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 含量均降低 ( $P<0.05$ ), PGE<sub>2</sub>含量显著降低 ( $P<0.01$ ); SSW组4种炎症因子含量均降低, 但无统计学差异; TXYF组IL-6、TNF- $\alpha$ 含量降低, IL-8、PGE<sub>2</sub>含量明显降低 ( $P<0.05$ )。结果表明, HQT对IL-6、IL-8、PGE<sub>2</sub>和TNF- $\alpha$ 均有显著抑制作用, TXYF对IL-8、PGE<sub>2</sub>有抑制作用, SSW的抑制炎症作用不显著。

## 4 3种复方对溃疡性结肠炎大鼠肠道菌群的影响

### 4.1 基础质控分析

由图3和图4可见, 各组的Shannon曲线与Rank曲线都较为平缓且集中, 表明测序数据量足够充分, 可以反映样本中绝大部分微生物信息。

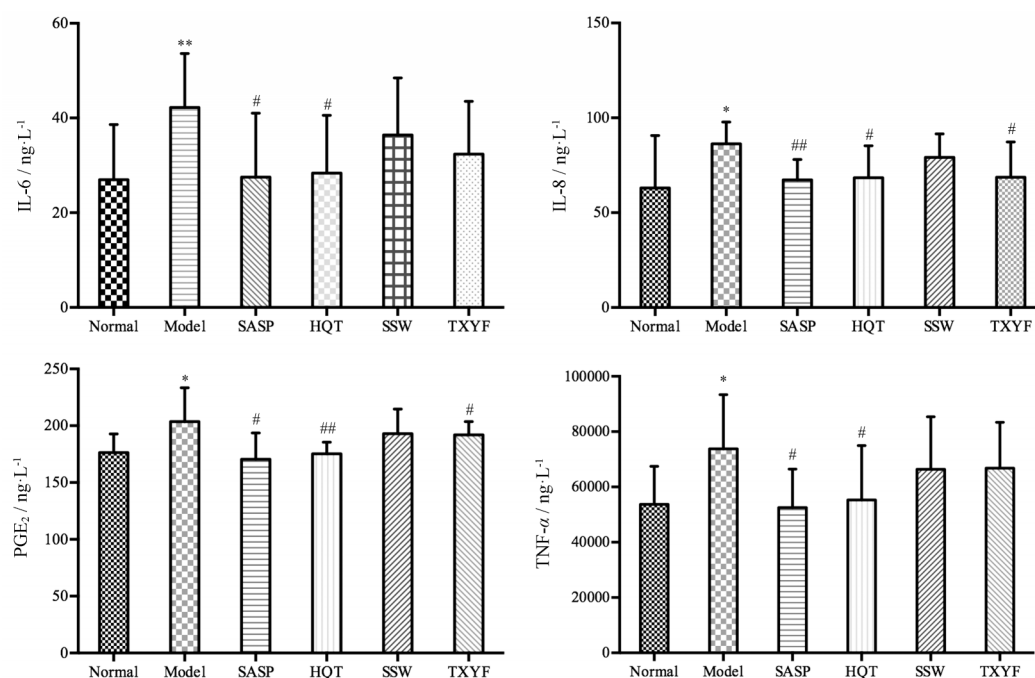
### 4.2 Alpha多样性分析

如表2及图5所示, 与模型组相比, HQT组和TXYF

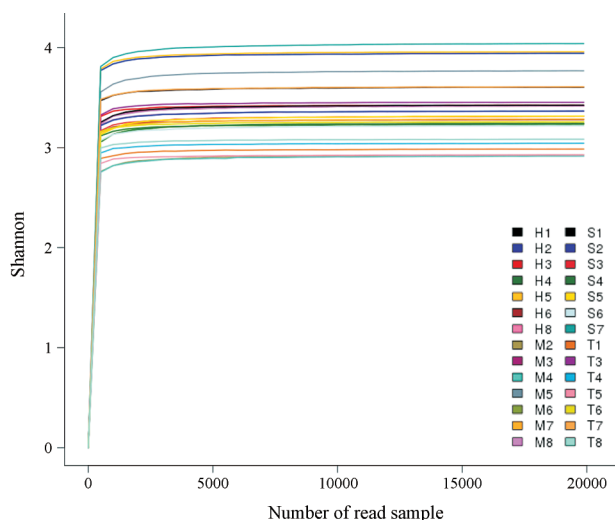
组的Chao1、goods-coverage、observed-species值均具有显著差异 ( $P<0.01$ ), SSW组无统计学意义。3组间两两比较, HQT组与SSW组、SSW组与TXYF组间有显著差异 ( $P<0.01$ ), HQT组与TXYF组之间差异明显 ( $P<0.05$ )。各组coverage值均大于0.9, 说明样本检测覆盖完全。与模型组相比, TXYF组菌群丰富度与OTU数目均显著降低, HQT次之, SSW组降低不明显。综上, 菌群物种丰度: SSW组>HQT组>TXYF组。

### 4.3 OUT聚类分析

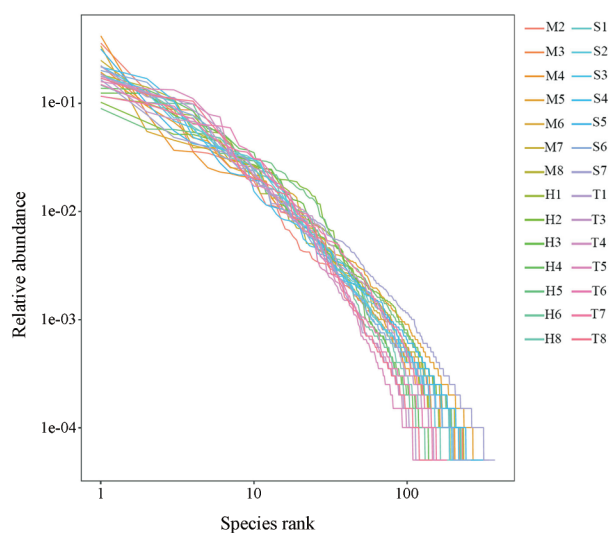
3组复方中有524个OTU, 其中共有OTU为207个。图6表明不同分组的物种组成情况, 包括样本中含有何种微生物及样本中各微生物的序列数, 即各微生物的相对丰度。在门水平上, 与模型组相比, HQT组、SSW组和TXYF组厚壁菌门 (p-Firmicutes) 均增加, 拟杆菌门 (p-Bacteroidetes) 均减少, 但无统计学意义; SSW组、TXYF组变形菌门 (p-Proteobacteria) 丰度显著减少、放线菌门 (p-Actinobacteria) 丰度显著增加 ( $P<0.05$ )。纲水平上, 与模型组相比, 3组梭菌纲 (c-Clostridia) 均增加, 拟杆菌纲 (c-Bacteroidia) 均减少, HQT组和TXYF组芽孢杆菌纲 (c-Bacilli) 丰度降低, 无统计学意义; 丹毒丝菌纲 (c-Erysipelotrichia)、变形菌纲 (c-Betaproteobacteria) 均显著增加 ( $P<0.05$ )。在目水平上, 与模型组相比, 3组的梭菌目 (o-Clostridiales)、乳杆菌目 (o-Lactobacillales) 均增加、拟杆菌目 (o-Bacteroidales) 减少, 无统计学意义; 3组的丹毒丝菌目 (o-



**Figure 2** Effects of three compounds on concentrations of interleukin (IL)-6, IL-8, tumor-necrosis-factor (TNF)- $\alpha$  and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) after 7 days oral administration on ulcerative colitis rats.  $n = 7$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs normal control; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  vs model control



**Figure 3** Multi-samples shannon-wiener curves. The abscissa represents sequencing depth, the ordinate represents the Shannon index. Samples of the model group indicated by M, samples of the HQT group indicated by H, samples of the SSW group indicated by S, samples of the TXYF group indicated by T



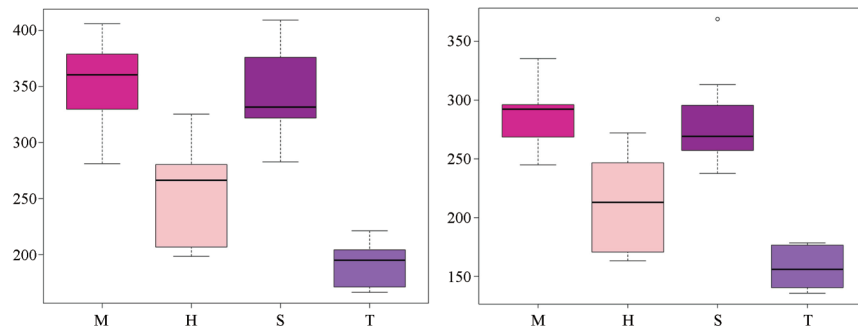
**Figure 4** Rank-abundance graph. The abscissa represents the grade of OTU, the ordinate represents the relative percentage of sequences in some grade. Samples of the model group indicated by M, samples of the HQT group indicated by H, samples of the SSW group indicated by S, samples of the TXYF group indicated by T

Erysipelotrichales)、伯克氏菌目 (o-Burkholderiales) 均显著增加 ( $P < 0.05$ ), 双歧杆菌目 (o-Bifidobacteriales) 均显著减少 ( $P < 0.01$ ), SSW 组和 TXYF 组的肠杆菌目 (o-Enterobacteriales) 均显著减少 ( $P < 0.05$ ), HQT 组显著增加 ( $P < 0.01$ )。在科水平上, 与模型组比较, 发现 HQT 组和 TXYF 组的乳杆菌科 (f-Lactobacillaceae) 均减少、毛螺菌科 (f-Lachnospiraceae) 均增加, SSW 组反

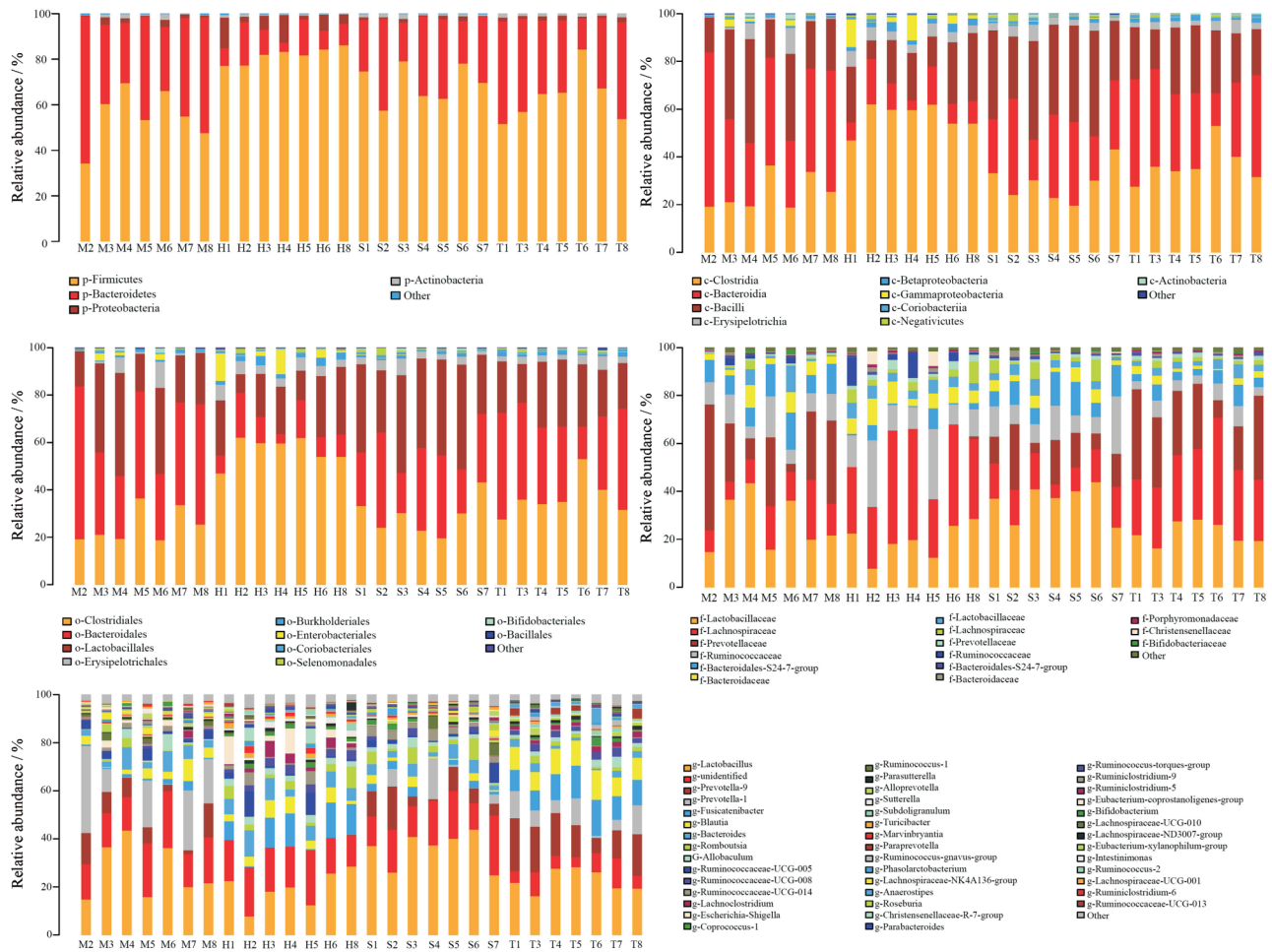
**Table 2** The rat gut microbiota diversity indexes in various groups. Samples of the model group indicated by M, samples of the HQT group indicated by H, samples of the SSW group indicated by S, samples of the TXYF group indicated by T

Sample ID	Chao1	Goods-coverage
M1	354.405 513	0.996 026 379
M2	360.492 180	0.996 205 22
M3	305.227 619	0.996 529 369
M4	406.048 662	0.995 869 893
M5	365.138 911	0.995 808 417
M6	281.167 701	0.996 998 826
M7	392.794 182	0.995 830 772
H1	273.555 184	0.997 233 555
H2	287.300 451	0.997 557 704
H3	213.217 051	0.997 820 377
H4	200.386 930	0.998 010 395
H5	325.390 529	0.996 926 172
H6	198.509 215	0.997 976 862
H7	266.402 599	0.996 926 172
S1	331.671 889	0.996 467 892
S2	282.801 068	0.996 831 163
S3	353.940 149	0.996 065 500
S4	330.909 408	0.996 685 855
S5	398.245 867	0.995 568 099
S6	312.994 363	0.996 607 612
S7	409.296 461	0.996 305 818
T1	171.804 821	0.998 463 086
T2	221.310 665	0.998 133 348
T3	195.074 333	0.997 730 956
T4	166.419 063	0.998 228 357
T5	204.667 626	0.998 083 049
T6	204.015 515	0.998 485 441
T7	170.546 242	0.998 524 563

之; 3 组的普罗沃氏菌科 (f-Prevotellaceae) 均减少、产碱杆菌科 (f-Alcaligenaceae) 均增加 ( $P < 0.05$ ), 以 HQT 组变化最为显著 ( $P < 0.01$ ); SSW 组和 TXYF 组拟杆菌科 (f-Bacteroidaceae) 丰度显著减少 ( $P < 0.05$ ), HQT 组丰度增加; 3 组的韦荣球菌科 (f-Erysipelotrichaceae) 显著增加 ( $P < 0.05$ )、链球菌科 (f-Peptococcaceae) 显著减少 ( $P < 0.01$ ); HQT 组和 SSW 组疣微菌科 (f-Ruminococcaceae) 丰度增加, TXYF 组则减少。在属水平上, 与模型组比较, HQT 组和 TXYF 组乳酸菌属 (*g-Lactobacillus*) 丰度减少, SSW 组反之; 3 组普雷沃菌属 (*g-Prevotella-9*, *g-Prevotella-1*) 均减少, HQT 组减少显著 ( $P < 0.01$ ); SSW 组和 TXYF 组拟杆菌属 (*g-Bacteroides*) 显著减少 ( $P < 0.05$ ), HQT 组丰度增加; 3 组瘤胃菌属 (*g-Ruminococcaceae*) 均显著减少 ( $P < 0.05$ ), 其中, TXYF 组 *g-Ruminococcaceae-UCG-005* 最为显著 ( $P < 0.01$ )、HQT 组、SSW 组 *g-Ruminococcaceae-gnavus-group* 丰度减少明显 ( $P < 0.01$ ); 3 组双歧杆菌属 (*g-Bifidobacterium*)、真杆菌属 (*g-Eubacterium-xylanophilum-group*) 均显著减少 ( $P < 0.01$ ); HQT 组和 TXYF 组罗氏



**Figure 5** The box diagram of alpha diversity indexes. Samples of the model group indicated by M, samples of the HQT group indicated by H, samples of the SSW group indicated by S, samples of the TXYF group indicated by T



**Figure 6** Microbial community bar plot by phylum, class, order, family and genus in four groups. Samples of the model group indicated by M, samples of the HQT group indicated by H, samples of the SSW group indicated by S, samples of the TXYF group indicated by T

菌属 (*g-Roseburia*) 丰度显著减少 ( $P<0.01$ ); SSW 组和 TXYF 组大肠杆菌志贺菌属 (*g-Escherichia-Shigella*) 丰度减少 ( $P<0.01$ ), HQT 组丰度增加。

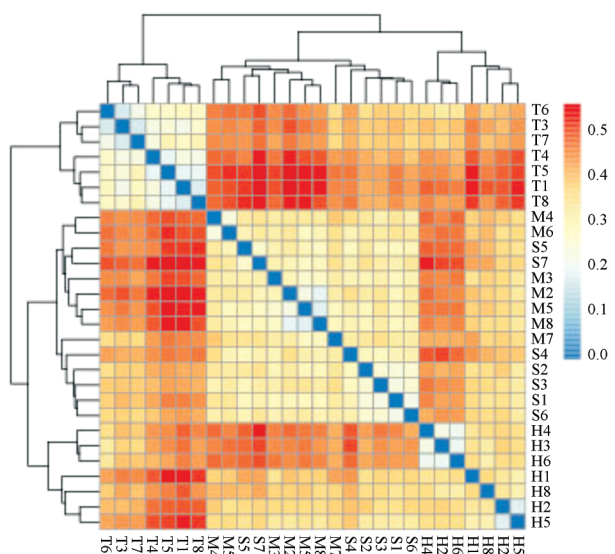
#### 4.4 Beta 多样性分析

**4.4.1 基于 Unifarc 的 Heatmap 分析** 如图 7 所示, 颜色的深浅代表样本与样本间相似性的高低, TXYF 组相似性明显高于模型组, 即样本间相似性 TXYF 组 >

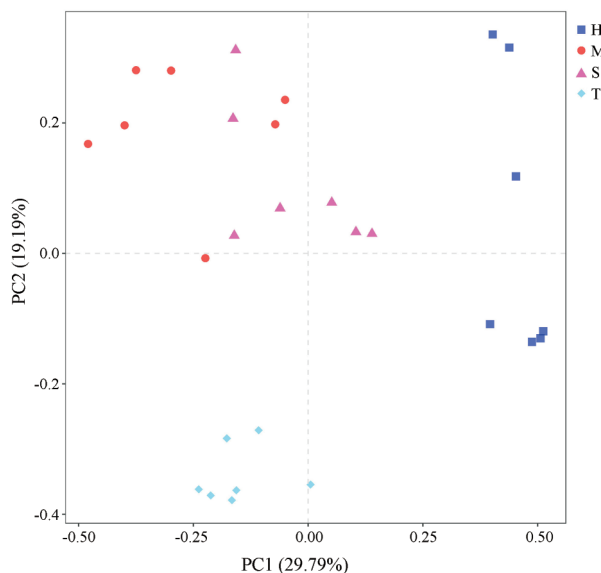
SSW 组 > HQT 组。

**4.4.2 PCA 分析** 如图 8 所示, 代表 SSW 组与模型组的点相对聚集, 其余两组的点与点之间则相对分散, 说明 SSW 组群落与模型组之间相似性较高, HQT 组和 TXYF 组菌群种类差异较大。

**4.4.3 LefSe 分析** 如图 9 所示, 乳杆菌科 (*f-Lactobacillales*) 和链球菌科 (*f-peptostreptocaccaceae*) 为 SSW



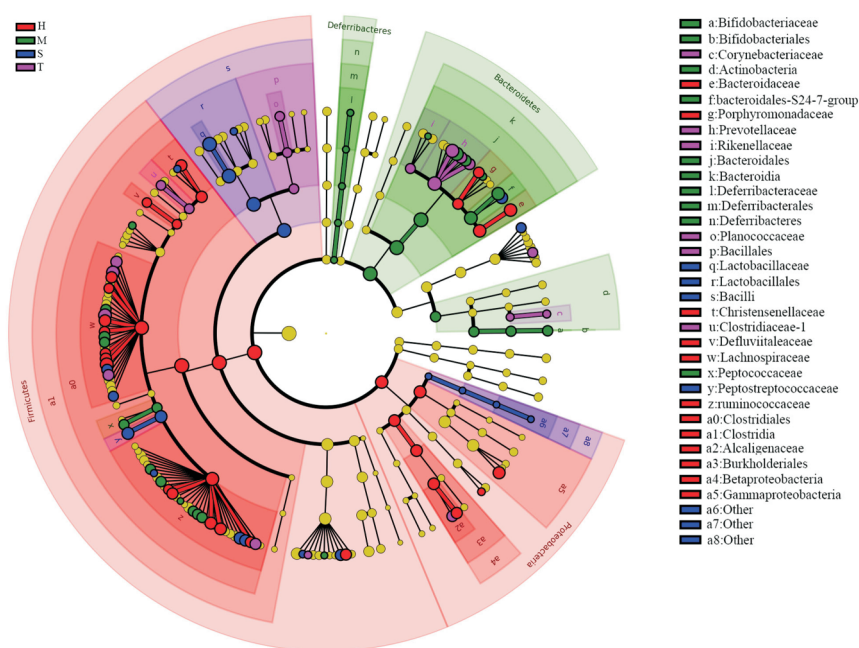
**Figure 7** Heatmap diagram of 28 samples. The horizontal and vertical coordinates represent the sample name. Samples of the model group indicated by M, samples of the HQT group indicated by H, samples of the SSW group indicated by S, samples of the TXYF group indicated by T



**Figure 8** The diagram of principal component analysis (PCA). Samples of the model group indicated by M, samples of the HQT group indicated by H, samples of the SSW group indicated by S, samples of the TXYF group indicated by T

组显著差异菌群。通过代谢组学研究揭示, 乳杆菌可以降低色氨酸分解代谢物——吲哚衍生物的作用, 吲哚衍生物为芳香烃受体 (AhR) 激活剂, 可局部调节 IL-22 的产生, Zelante 等<sup>[13]</sup>发现吲哚衍生物或产生它们的益生菌可用作肠道生态失调患者的支持疗法。肺炎链球菌脂蛋白与巨噬细胞 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 和核转录因子 Kappa B (Nuclear factor- $\kappa$ B, NF-

$\kappa$ B) 介导的炎症反应密切相关<sup>[14]</sup>, 在肺炎链球菌肺炎期间, 中性粒细胞的聚集和 ELR+CXC 趋化因子的表达需要来自早期反应的细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-1 的上游信号传导。普雷沃氏菌科 (f-Prevotellaceae)、理研菌科 (f-Rikenellaceae)、梭菌属 (*g-clostridium-innocuum-group*) 为 TXYF 组显著差异菌群。在 UC 病理状态下, 结肠黏膜黏液层厚度减少, 可能与黏蛋白合成分泌减少即细菌主动降解增加有关, 普雷沃氏菌科可能通过



**Figure 9** Cladogram. Difference in dominant microorganisms between four groups. Samples of the model group indicated by M, samples of the HQT group indicated by H, samples of the SSW group indicated by S, samples of the TXYF group indicated by T

产生主动降解黏液寡糖的硫酸酯酶来破坏黏膜屏障功能<sup>[15]</sup>。研究表明<sup>[16]</sup>, 理研菌科可以将肠道中的T细胞异常激活, CTLA-4与PD01含量降低, 最终导致炎性细胞因子的分泌、炎症细胞聚集和肠损伤。梭菌属具有抗炎作用, 其减少与更强烈的TLR2和TLR4表达相关, 能够有效改善慢性低度炎症模型的肠上皮细胞屏障损伤。HQT组具有显著差异存在的菌群为毛螺菌科 (*f-Lachnospiraceae*)、瘤胃菌科 (*f-Ruminococcaceae*)、大肠杆菌科 (*f-Gammaproteobacteria*)、大肠杆菌科志贺菌属 (*g-Escherichia-Shigella*) 和紫单胞菌科 (*f-Porphyrromonadaceae*)。Nakanishi等<sup>[17]</sup>研究发现, 在万古霉素处理的小鼠中, 毛螺菌科明显减少, 毛螺菌科家族触发单核细胞/巨噬细胞流入结肠固有层, 激活宿主免疫反应, 使TNF- $\alpha$ 与iNOS在浸润的单核细胞和巨噬细胞中高表达。瘤胃菌科<sup>[18]</sup>的显著增加与肠细胞损伤和结肠中促炎性细胞因子分泌减少有关, 可导致宿主血浆、肝脏、尿液和肠道中微生物浓度改变, 从而允许纤维诱导的抗炎效应发挥作用。大肠杆菌科是肠道生态失调的主要诱因之一, 在炎性肠病患者肠道中, 黏附侵入型大肠杆菌定植和Toll样受体TLR表达增加, Gillian等<sup>[19]</sup>研究证明在不诱导细菌毒力的情况下, 5-HT增强结肠上皮细胞中大肠杆菌诱导的信号传导, 即NADPH氧化酶依赖性超氧化物的产生, 从而导致IL-8、TLR2、TLR4上调。紫单胞菌科是结肠中主要的有益菌之一<sup>[20]</sup>, 它可以通过调节结肠黏膜中的基因表达, 并通过在结肠中产生短链脂肪酸来增加能量可用性, 促进宿主代谢效率。

## 讨论

“方证对应”是中医学经典中蕴藏的一种独特的疾病辩证模式<sup>[21]</sup>, 是指使方剂与疾病病因病机和外在症状相契合的思维过程, 因所针对病机不同, 根据方证对应思想, 遣方用药也应有差异。随着UC发病率的逐年升高, 越来越多的临床应用发现HQT、SSW和TXZF均对其有治疗作用。

通过对IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 、PGE<sub>2</sub>等炎性因子的检测, 发现3种复方对炎性因子均有不同程度的抑制作用, HQT抑制炎症作用最为显著。尽管目前结肠炎的确切病因尚未明确, 但普遍认为炎症性肠病是一种自身免疫性疾病, 即肠腔内抗原具有初始缺陷或免疫应答激活黏膜易感性, 因此, 来自免疫细胞的炎性细胞因子的过量产生会导致黏膜损伤及持久的炎症反应。TNF- $\alpha$ 是黏膜炎症发病机制中关键的炎性细胞因子之一, 它控制多种细胞过程, 如炎症介质的产生、细胞增殖和存活和不同细胞的凋亡方式等。有研究表明<sup>[22]</sup>,

TNF- $\alpha$ 调节肠黏液分泌、控制溶质的流入和流出、间接影响肠上皮细胞与免疫细胞之间的相互作用。IL-6已被证明通过激活claudin-2基因来调节肠上皮紧密连接<sup>[23]</sup>, Wang等<sup>[24]</sup>发现IL-6通过keratin-8依赖机制引起Caco-2细胞屏障性渗透功能增强, 细胞角蛋白8 (keratin-8)水平升高, IL-6治疗还可以预防出血性休克诱导的小鼠肠道屏障破坏和肠道炎症<sup>[25]</sup>。IL-8能够有效刺激单核细胞释放细胞因子, 同时单核细胞衍生的IL-8作为其他先天性骨髓细胞 (如中性粒细胞) 的有效化学引诱物, 会导致炎性因子增加和炎症持续存在, 这种炎症的恶性循环是炎症性肠病黏膜损伤发生的基础。O'Dwyer等<sup>[26]</sup>发现熊去氧胆酸 (UDCA) 可以抑制TNF- $\alpha$ 诱导单核细胞分泌IL-8。PGE<sub>2</sub>可能增加血管通透性并引起水肿, 诱导白细胞趋化, 导致炎性细胞浸润造成结肠黏膜炎症、组织损伤和溃疡。临床研究<sup>[27]</sup>表明UC患者黏膜PGE<sub>2</sub>含量显著增加且与黏膜炎症程度正相关。

此外, 对肠道菌群进行测序发现, HQT能显著改善菌群物种丰度、降低样本间相似性、增加肠内益生菌含量, 进而修复肠道损伤、平衡肠内局部微环境及酸碱度。一些细菌能够诱导炎症, 因此结肠中炎症的发展和其他相关的免疫变化, 即促炎性因子的诱导和细胞因子介导的反应可能影响微生物群的生态平衡, 造成菌群变化。微生物群的一些成分与黏液层密切相关, 黏液层作为屏障的作用至关重要。当黏液层受到炎症、遗传损失或肠道细菌过度消耗的影响时, 可导致炎症信号传导和结肠炎的增加, 与黏液层构成相关的缺陷会破坏微生物群与宿主之间的关系, 可引起针对易患疾病的微生物群的免疫应答。细菌之间的差异可能出现在不同形式的脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 或其他TLR激动剂/拮抗剂的表达中, 从而影响大鼠的炎症、碳水化合物利用的生理差异和抗炎代谢物的产生 (如短链脂肪酸)<sup>[28]</sup>。

本实验采用TNBS模型, 更接近于中医证候里的“湿热痢”, 从实验结果来看, HQT在抗炎及改善肠道菌群稳态方面作用最为显著, 其余两方剂也有一定的治疗作用, 同时可间接证明中医方证对应理论的科学性。但由于本研究数据量较少, 且未与临床患者样本研究相结合, 仅对临床研究提供参考, 以期早日完全阐明UC机制。

## References

- [1] Steiner S, Daniel C, Fischer A, et al. Cyclosporine a regulates pro-inflammatory cytokine production in ulcerative colitis [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2015, 63: 53-63.

- [2] Lam W, Bussom S, Guan F, et al. The four-herb Chinese medicine PHY906 reduces chemotherapy induced gastrointestinal toxicity [J]. *Sci Transl Med*, 2010, 2: 45ra-59.
- [3] Wang Y, He LJ, Zhu XD, et al. Effect of Si-Shen-Wan on serum of TGF $\beta_1$ , IL-6 and colonic tissue of TLR-4 mRNA expression in rats with ulcerative colitis of spleen-kidney deficiency [J]. *Acta Chin Med Pharmacol (中医药学报)*, 2015, 43: 118-122.
- [4] Yin Y, Zhong L, Wang JW, et al. Tong Xie Yao Fang relieves irritable bowel syndrome in rats *via* mechanisms involving regulation of 5-hydroxytryptamine and substance P [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21: 4536-4546.
- [5] Li T, Zhuang SX, Wang YW, et al. Flavonoid profiling of a traditional Chinese medicine formula of Huangqin Tang using high performance liquid chromatography [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2016, 6: 148-157.
- [6] Su J, Liu YL, Guo Y, et al. Simultaneous determination of 7 active constituents in Si-Shen-Wan by HPLC under multiple UV wavelengths [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2013, 33: 1531-1537.
- [7] Hu Y, Zheng YL, Mei QX, et al. Simultaneous determination of seven active ingredients in Tong-Xie-Yao-Fang formula and ultrafine granular powder by ultra-performance liquid chromatography [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol (中药新药与临床药理)*, 2017, 28: 786-791.
- [8] Morris GP, Beck PL, Herridge MS, et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon [J]. *Gastroenterology*, 1989, 96: 795-803.
- [9] Amato KR, Yeoman CJ, Kent A, et al. Habitat degradation impacts black howler monkey (*alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes [J]. *ISME J*, 2013, 7: 1344-1353.
- [10] Bates ST, Clemente JC, Flores GE, et al. Global biogeography of highly diverse protistan communities in soil [J]. *ISME J*, 2013, 7: 652-659.
- [11] Schloss PD, Gevers D, Westcott SL. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-Based studies [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e27310.
- [12] Wang Y, Sheng HF, He Y, et al. Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of illumina tags [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78: 8264-8271.
- [13] Zelante T, Iannitti RG, Cunha C, et al. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity *via* interleukin-22 [J]. *Immunity*, 2013, 39: 372-385.
- [14] Dong LN, Wang JP, Liu P, et al. Faecal and mucosal microbiota in patients with functional gastrointestinal disorders: correlation with toll-like receptor 2/toll-like receptor 4 expression [J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23: 6665-6673.
- [15] Wright DP, Rosendale DI, Robertson AM, et al. Prevotella enzymes involved in mucin oligosaccharide degradation and evidence for a small operon of genes expressed during growth on mucin [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, 190: 73-79.
- [16] Park SJ, Kim JH, Song MY, et al. PD-1 deficiency protects experimental colitis *via* alteration of gut microbiota [J]. *BMB Rep*, 2017, 50: 578-583.
- [17] Nakanishi Y, Sato T, Ohteki T. Commensal gram-positive bacteria initiates colitis by inducing monocyte/macrophage mobilization [J]. *Mucosal Immunology*, 2015, 8: 152-160.
- [18] Bruno L, Mathias LR, Valentin L, et al. CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands [J]. *Nat Med*, 2016, 22: 598-605.
- [19] Gillian T, Suneeta C, Tracey P, et al. TLR-mediated inflammatory responses to streptococcus pneumoniae are highly on surface expression of bacterial lipoproteins [J]. *J Immunol*, 2014, 193: 3736-3745.
- [20] Banskota S, Regmi SC, Gautam J, et al. Serotonin disturbs colon epithelial tolerance of commensal *E. coli* by increasing NOX2-derived superoxide [J]. *Free Radical Biol Med*, 2017, 106: 196-207.
- [21] Wang J, Xiong XJ. Discussion on corresponding features of Fang-Zheng [J]. *J Tradit Chin Med (中医杂志)*, 2010, 51: 200-203.
- [22] Mi H, Liu FB, Li HW, et al. Anti-inflammatory effect of Chang-An-Shuan on TNBS-induced experimental colitis in rats [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17: 315.
- [23] Al-sadi R, Ye DM, Boivin M, et al. Interleukin-6 modulation of intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by JNK pathway activation of claudin-2 gene [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e85345.
- [24] Wang L, Srinivasan S, Theiss AL, et al. Interleukin-6 induces keratin expression in intestinal epithelial cells: potential role of keratin-8 in interleukin-6-induced barrier function alterations [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 8219-8227.
- [25] Rollwagen FM, Yu ZY, Li YY, et al. IL-6 rescues enterocytes from hemorrhage induced apoptosis *in vivo* and *in vitro* by a bcl-2 mediated mechanism [J]. *Clin Immunol Immunopathol*, 1998, 89: 205-213.
- [26] O'Dwyer AM, Lajczak NK, Keyes JA, et al. Ursodeoxycholic acid inhibits TNF- $\alpha$ -induced IL-8 release from monocytes [J]. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol*, 2016, 311: G334-G341.
- [27] Perez-Muñoz ME, Bergstrom K, Peng V, et al. Discordance between changes in the gut microbiota and pathogenicity in a mouse model of spontaneous colitis [J]. *Gut Microbes*, 2014, 5: 286-295.
- [28] Guan F, Wang H, Shan Y, et al. Inhibition of COX-2 and PGE in LPS-stimulated RAW264.7 cells by Ionimacranthoide VI, a chlorogenic acid ester saponin [J]. *Biomed Rep*, 2014, 2: 760-764.