

• 研究论文 •

白皮杉醇调控肠道菌群减轻慢性肾病模型小鼠并发系统性炎症

李成曦, 王颖异, 王雨萌, 尹佳婷, 杨淑惠, 刘云, 段金廛, 郭建明*

(南京中医药大学, 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023)

摘要: 本研究探讨天然小分子化合物白皮杉醇 (PIC) 对腺嘌呤诱导的慢性肾病 (CKD) 模型小鼠体内炎症水平的影响, 并基于肠道菌群探讨其作用机制。动物实验遵循南京中医药大学动物伦理委员会规定。采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测小鼠体内炎症因子白介素 6 (IL-6) 及肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平; 液质联用法检测促炎毒素分子硫酸吲哚酚 (IS)、硫酸对甲酚 (PCS) 水平; 蛋白印迹方法检测肠道紧密连接蛋白 occludin 表达; 肠道细菌体外厌氧培养技术检测 IS 的前体分子吲哚在肠道细菌中的合成; 采用 16S rDNA 测序检测肠道菌群丰度。结果发现, PIC 对 CKD 模型小鼠肾脏组织炎性浸润无改善作用, 但可降低模型小鼠血液中 IL-6 以及结肠组织中 IL-6 及 TNF- α 水平。PIC 对 CKD 模型小鼠肠道中缺失的 occludin 蛋白无改善作用; 但可显著降低模型小鼠血液以及肝脏中 IS、PCS 水平。进一步研究表明, PIC 可抑制尿毒素 IS 前体吲哚在肠道细菌中的合成; 降低肠道中吲哚合成细菌的丰度水平。综上所述, PIC 可调控肠道菌群, 抑制尿毒素前体的合成, 进而减轻尿毒素 IS、PCS 在体内的蓄积, 改善 CKD 小鼠并发的体内炎症。

关键词: 慢性肾病; 系统性炎症; 白皮杉醇; 肠道菌群; 尿毒素

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)02-0364-11

Piceatannol alleviates host inflammation in chronic kidney disease model mice through regulating gut microbiota

LI Cheng-xi, WANG Ying-yi, WANG Yu-meng, YIN Jia-ting, YANG Shu-hui,
LIU Yun, DUAN Jin-ao, GUO Jian-ming*

(Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

Abstract: The purpose of this research is to study the effect of small molecule compound piceatannol (PIC) on host inflammation in adenine induced chronic kidney disease (CKD) mice, and then to explore its mechanism based on the regulation of gut microbiota. All procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Nanjing University of Chinese Medicine. The level of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); UPLC-TQ/MS technology was used to monitor the level of proinflammatory uremic toxin indoxyl sulfate (IS) and *p*-cresol sulfate (PCS); the expression of occludin was tested by Western blot; *in vitro* anaerobic culture of gut bacteria was used to produce indole; the abundance of gut microbiota was evaluated by 16S rDNA sequencing. The results showed that PIC had no effect on inflammatory infiltration in kidney tissue of CKD mice, but could decrease IL-6 level in blood and IL-6/TNF- α level in colon tissue. PIC did not improve intestinal occludin protein expression in CKD mice; while it could significantly reduce the levels of IS and PCS in blood and liver of CKD mice. Further mechanism studies showed that PIC could inhibit the synthesis of IS precursor indole in gut bacteria. Moreover, PIC could decrease

收稿日期: 2021-07-05; 修回日期: 2021-07-21.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773983).

*通讯作者 Tel: 86-25-85811917, E-mail: njguo@njucm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0990

the abundance of gut bacteria which producing uremic toxin, such as reducing the abundance of indole and *p*-cresol producing gut bacteria. In conclusion, PIC could regulate gut microbiota and inhibit the synthesis of uremic toxin precursor, thereafter reducing the accumulation of IS and PCS *in vivo*, ultimately relieving the inflammation of CKD mice.

Key words: chronic kidney disease; host inflammation; piceatannol; gut microbiota; uremic toxin

慢性肾病 (chronic kidney disease, CKD) 是慢性疾病家族中的重要成员, 在全球范围内流行性极广, 其发病率约为 10%~13%^[1,2]。CKD 可导致多种并发症, 如心血管疾病、全身性炎症、糖尿病、高血压、肥胖、贫血等^[3]。其中, CKD 患者并发的全身性炎症可加速患者心血管疾病的发展^[4], 促进蛋白质能量消耗, 加重患者营养不良, 是公认的增加终末期肾病患者死亡率的重要原因。

CKD 患者体内炎症的发生有多种原因, 如尿素素、尿毒症环境产生氧化应激、代谢性酸中毒、维生素 D 缺乏^[5]等。其中尿素素是诱发 CKD 患者宿主炎症的重要因素, 多项研究表明, 小分子尿素素-尿素, 可降低肠上皮细胞紧密连接蛋白的表达, 破坏肠上皮屏障功能^[6,7]。肠上皮屏障受损后, 可导致细菌毒素和其他有毒物质, 如蛋白结合型尿素素硫酸吡啶酚 (IS)、硫酸对甲酚 (PCS) 等, 进入肠壁和体循环。IS、PCS 可促进体内炎症因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素 (IL) 6 及和 IL-1 β 的表达^[8,9], 从而加剧宿主局部及全身炎症。

白皮杉醇 (piceatannol, PIC) 是一种多酚羟基类化合物, 主要存在于葡萄皮、百香果以及红酒中, 也是大黄、虎杖等多种中药的活性成分^[10], 具有多种药理活性, 如抗肿瘤、抗氧化、抗炎^[11]等。已有多项报道证实, PIC 具有良好的抗炎作用。PIC 可改善糖尿病心肌病大鼠体内的炎症水平^[11], 降低肾损伤大鼠体内炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 的水平^[12]; 体外细胞实验也证实 PIC 可以抑制脂多糖诱导的 NF- κ B 活化, 减轻炎症反应^[13]。但是, PIC 用于改善 CKD 并发系统性炎症的研究较少。为此, 本研究将采用腺嘌呤诱导的 CKD 模型小鼠, 从调控 CKD 并发系统性炎症方面探讨 PIC 抗炎作用及作用机制。

材料与方 法

药物、试剂 PIC 标准品购自成都普瑞法科技开发有限公司, 纯度 > 98%; occludin 抗体、RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂购自南京迅贝生物科技有限公司; 氯霉素购自中国材料研究中心; 生理盐水购自山东齐都药业有限公司; 肌酐、尿素氮试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 检测血清以及组织中 IL-6、TNF- α 水平的 ELISA 试剂盒购自南京建成生物工程研究所以及上

海酶联生物科技有限公司; 腺嘌呤、IS、PCS、二甲基亚砷 (DMSO) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液购自苏州新赛美生物科技有限公司; 质谱级乙腈购自德国 Merck 公司; 质谱级甲酸购自天津市科密欧化学试剂有限公司。

实验菌株 大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 由健康人粪便中分离鉴定而得, 经生工生物工程 (上海) 16S rDNA 序列分析结果可知, 该菌与 *E. coli* 菌株 NCTC8623 相似度为 100%。*E. coli* 标准菌株 ATCC8739 购自广东省微生物菌种保藏中心。

实验动物 雄性 SPF 级的 C57BL/6J 小鼠, 体重 18~25 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 (北京, 中国), 许可证号: SCXK(京)2017-0001。实验小鼠均饲养于南京中医药大学药物实验动物中心, 所有动物研究均遵循南京中医药大学动物伦理委员会的指导方针, 伦理审核号: 201805A002。

动物分组、造模及给药 动物分组: 将 38 只 C57BL/6J 小鼠随机分为 3 组, 正常对照组、腺嘌呤模型组以及 PIC 给药组。造模: 腺嘌呤诱导慢性肾病小鼠造模方法参考文献^[14], 即正常对照组每日灌胃 0.5% 羧甲基纤维素钠水溶液; 腺嘌呤模型组每日灌胃含有腺嘌呤的 0.5% 羧甲基纤维素钠, 腺嘌呤剂量为 50 mg·kg⁻¹。小鼠每日灌胃体积为 0.1 mL/10 g, 连续灌胃 4 周。造模结束后, 小鼠静养一周。给药: 正常对照组以及腺嘌呤模型组每日灌胃生理盐水, 灌胃体积为 0.1 mL/10 g; PIC 给药组每日灌胃 80 mg·kg⁻¹ PIC 水溶液, 灌胃体积为 0.1 mL/10 g; 连续灌胃 4 周。实验结束后取各组小鼠血浆、肝脏、肾脏以及盲肠、结肠组织及其内容物。

血清、肝脏及肾脏样品采集与处理 采用眼眶采血法收集小鼠全血, 室温静置 2 h, 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 离心后取上清即得血清。取固定部位的肝脏及肾脏于离心管中, 以 1:1 的比例加入 PBS 进行匀浆, 匀浆后 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清。所有样品以 10:1 比例加入 200 μ g·mL⁻¹ 氯霉素作为内标物, 再以 1:3 比例加入乙腈, 充分混匀, 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清至进样小瓶中, 待测。

血清、肝脏及肾脏样品中 IS、PCS 分析 色谱条件: 采用 Acquity UHPLC™ 系统 (美国 Waters 公司)、

Acquity UHPLC BEH C18 色谱柱 (2.1 mm I.D. × 100 mm, 1.7 μm) 进行色谱分析。条件为: 柱温 35 °C, 自动进样器温度 4 °C。流动相 (A) 由 0.1% 甲酸-水溶液以及 (B) 乙腈构成。梯度洗脱条件: (0~1.0 min) 14%~21% B, (1.0~4.0 min) 21%~40% B, (4.0~4.2 min) 40%~95% B, (4.2~5.0 min) 95% B, (5.0~5.2 min) 95%~14% B, (5.2~5.5 min) 14% B。流速: 0.4 mL·min⁻¹。进样体积 2 μL。质谱条件: 采用 Xevo Triple Quadrupole Mass Spectrometer (TQ/MS) (美国 Waters 公司)、选择性反应监测法进行质谱分析。IS、PCS 及氯霉素的最佳检测条件如表 1。

血清及结肠组织中 IL-6 和 TNF-α 含量的测定 血清: 取适量体积血清, 采用 ELISA 试剂盒, 按照试剂盒的说明检测血清中 IL-6 及 TNF-α 的含量; 结肠组织: 取适量结肠组织, 加入一定量的 PBS 缓冲液制成结肠组织匀浆, 2 500 r·min⁻¹, 离心 20 min, 取上清。通过 BCA 法测蛋白浓度, 采用 ELISA 试剂盒检测结肠组织中 IL-6 及 TNF-α 的含量。

盲肠以及结肠内容物的处理 给药 PIC 4 周后, 收集小鼠盲肠、结肠内容物于离心管中, 以 1:4 的比例加入 PBS 溶液匀浆, 匀浆后 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清至进样小瓶中, 待测。

PIC 药物配制 精密称 PIC 标准品粉末, 用 DMSO 溶解至浓度为 500 mmol·L⁻¹ 储备液置于 -20 °C 冰箱中备用。每次实验前, 用无菌 LB 培养液稀释至 5 mmol·L⁻¹ 作为给药液。以无菌 LB 培养液稀释的 1% DMSO 作为实验溶剂对照溶液。

单株细菌培养及给药 取冻存的单株细菌加至 5 mL LB 培养液中, 厌氧箱中 37 °C 条件下过夜活化后, 将活化好的单菌稀释至相应浓度。每个培养管加 480 μL 稀释后的菌液, 并继续置于 37 °C 厌氧箱中培养。实时监测其 A₆₀₀ 值, 待其达到 0.2 左右, 每管给药 20 μL 适量浓度的 PIC, 混匀, 按规定时间厌氧培养。培养结束后在酶标仪 600 nm 下检测细菌的 A₆₀₀ 值。

粪便混合菌的培养及给药 新鲜粪便样品采集于正常 7~8 周龄的 C57BL/6J 小鼠并置于 1 mL 离心管中, 以 1:4 的比例加入生理盐水进行匀浆, 200 ×g、10 min, 离心取上清, 即为小鼠肠道细菌母液。用无菌 LB 液体培养基将母液稀释后, 固定 A₆₀₀ 值用于实验。在前期实

验中, 观察了 A₆₀₀ 不同数值时实验的稳定性, 最终发现在 A₆₀₀ 值为 0.1 时, 肠道细菌可以稳定生成吲哚。在 1.5 mL 无菌离心管中加入混合菌液 480 μL 和 20 μL DMSO 作为对照组; 加入混合菌液 480 μL 和不同浓度的 20 μL PIC, 即为给药组。每组样品平行 3 次, 在 37 °C 厌氧培养相应时间。

细菌样品的处理 将培养好的菌液 10 000 r·min⁻¹, 3 min 离心, 取上清, 按 1:3 的比例加乙腈沉淀蛋白, 涡旋混匀, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清 200 μL 加入进样瓶中。

HPLC-FLD 检测吲哚浓度 色谱条件: 色谱柱: 250 mm×4.6 mm C18 柱 (Alltima, USA); 流动相: 70% 乙腈-30% 乙酸铵缓冲溶液 (200 mmol·L⁻¹, pH = 4.5); 流速: 1 mL·min⁻¹; 柱温: 35 °C; 保留时间: 4.4 min, 检测波长: 270~340 nm; 进样时间: 7 min; 进样体积: 10 μL。

肠道细菌 16S rDNA 测序 取各组小鼠新鲜粪便进行测序。16S rDNA 测序委托百迈克生物科技有限公司 (北京) 进行。测序通过进行 OTUs (operational taxonomic units) 聚类, 并进行物种注释及丰度分析, 揭示样品的物种构成。

组织病理评价 待测肾脏、结肠组织样本经 4% 多聚甲醛固定, 委托武汉赛维尔生物科技有限公司进行修剪、脱水、石蜡包埋、切片以及进行苏木精和伊红 (HE) 染色。显微镜下观察炎性细胞浸润程度, 并进行组织病理学评分。肾脏病理评分由专业病理学研究员在显微镜下查看 HE 染色后的病理切片进行评分。肾脏病理评分标准: 0、未见明显炎性细胞浸润; 1、少量炎性细胞浸润, 肾小球淤血不明显; 2、炎性细胞浸润明显, 部分肾小球淤血, 管腔堵塞; 3、大量炎性细胞浸润, 出现明显器质性损伤。结肠组织病理评分如表 2。

免疫印迹分析 将结肠组织匀浆于含有蛋白酶和 RIPA 裂解缓冲液中, 取上清, 用 BCA 法测定上清中蛋白浓度, 将样品调整至合适浓度, 用 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液溶解, 并在膜上进行转膜。在膜上用兔抗 occludin 抗体, GAPDH 用作对照内参, 最后在曝光仪中观察条带。

统计学方法 实验结果采用 GraphPad Prism8 软件分析。实验数据采用 mean ± SEM 表示, n ≥ 3。以 P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

Table 1 Optimal detection conditions for compounds by UHPLC-TQ/MS. IS: Indoxyl sulfate; PCS: *p*-Cresyl sulphate

Compound	Ionization mode	Parent (<i>m/z</i>)	Daughter (<i>m/z</i>)	Cone/V	Collision/V	Retention time/min
IS	ES ⁻	212.031 9	79.967 7	22	24	2.06
PCS	ES ⁻	187.031 9	107.046 1	24	22	2.47
Chloramphenicol	ES ⁻	321.095 8	151.798 1	24	18	3.38

Table 2 Histological grading of colitis

Feature graded	Grade	Description
Inflammation	0	None
	1	Slight
	2	Moderate
	3	Severe
Extent	0	None
	1	Mucosa
	2	Mucosa and submucosa
	3	Transmural
Crypt damage	0	None
	1	Basal 1/3 damaged
	2	Basal 2/3 damaged
	3	Only surface epithelium intact
	4	Entire crypt and epithelium lost

结果

1 PIC可改善CKD模型小鼠的肾脏功能

小鼠灌胃腺嘌呤4周后, 体重显著下降(图1A); 一周后, 灌胃给药PIC 4周, 检测小鼠饮水量以及血清中尿素氮肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)水平, 观察PIC对小鼠肾脏功能的影响。结果发现, 与空白对照组相比, 模型组小鼠饮水量显著上升、血清中Cr、BUN也明显升高; PIC对CKD模型小鼠的饮水量无显著影响, 但可显著降低模型小鼠血清中的Cr、BUN水平(图1B~D)。HE染色结果发现, CKD模型小鼠肾小球体积缩小, 肾小囊轻微扩张(红色箭头)以及大范围的肾小管损伤, 甚至正常肾小管组织结构消失, 肾小管数量减少。给予PIC后, 对肾小管的损伤无明显改善作用(红色箭头); 但可一定程度上恢复肾小管数量(黄色箭头)(图1E)。Masson染色结果也表明, CKD模型小鼠肾小管损伤严重, 并伴随着显著的肾小管间质纤维化, 而PIC对肾小管的间质纤维化具有一定改善作用(图1F)。结合血肌酐与尿素氮的结果, 提示PIC对CKD模型小鼠受损的肾脏功能具有一定改善作用。

2 PIC对CKD模型小鼠肾脏炎症水平无改善作用, 但可改善模型小鼠全身性炎症以及结肠组织炎症水平

肾脏病理检测结果发现, 模型组小鼠肾脏肾小球基质增多(黑色箭头); 可见大范围的肾小管损伤、数量减少(蓝色箭头); 损伤处可见肾小管扩张(绿色箭头), 伴散在的炎性细胞浸润(黄色箭头)(图2A)。给药PIC后, 小鼠肾脏仍可见较多炎性细胞浸润。此结果表明, PIC对CKD小鼠的肾脏炎性浸润并无改善作用。

有研究报道^[15], CKD模型小鼠伴随着宿主炎症水平的升高, 表现为血液中IL-6、TNF- α 水平升高, 因此本研究检测了CKD小鼠血清中的炎症因子水平。与文献报道相符, CKD模型小鼠血清中炎症因子IL-6、TNF- α 水平显著升高, 给药PIC可降低小鼠血清中促

炎因子IL-6的水平, 但对TNF- α 无明显改善作用(图2B、C)。表明PIC在一定程度上可减轻CKD小鼠系统性炎症水平。

与此同时, 本研究发现CKD模型小鼠出现轻微的结肠炎症, 表现为较多上皮细胞核固缩(黑色箭头), 以及结肠组织固有层出现少量的淋巴细胞浸润(黄色箭头)(图2F)。此现象与Vaziri等^[6]在SD大鼠上研究结果相似, 表明CKD模型小鼠出现肠道炎症。PIC给药之后, 可减轻结肠组织固有层的炎性浸润; 同时还可降低结肠组织中促炎因子TNF- α 、IL-6的水平(图2D、E)。

3 PIC对CKD模型小鼠肠屏障无修复作用, 但可降低模型小鼠体内尿毒素IS及PCS水平

CKD并发的宿主炎症与肠上皮屏障受损有关。肠屏障功能障碍会引起腔内病原体侵入固有层, 进一步触发免疫失调, 是慢性结肠炎症的诱因^[16,17]。上文研究表明, PIC在降低宿主炎症水平的同时, 可改善肠道炎症。那么, PIC是否可通过修复肠上皮屏障功能, 改善肠道炎症, 进而改善宿主炎症?

Occludin是一种肠道紧密连接蛋白, 其缺失或表达减少可导致肠屏障功能丧失^[18]。本研究发现, CKD模型小鼠结肠组织中occludin蛋白表达降低; 然而PIC对occludin蛋白的表达并没有改善作用(图3A), 说明PIC并不是通过改善肠屏障功能来减轻肠道炎症的。

在肠屏障功能受损的情况下, 可导致细菌毒素和其他有毒物质如蛋白结合性尿毒素IS和PCS进入肠壁和体循环, 加剧宿主系统性炎症^[19,21]。PIC给药4周后, CKD小鼠血清及肝脏中IS、PCS水平下降(图3B、C), 但是对肾脏中IS、PCS水平无明显作用(图3D)。CKD小鼠体内IS、PCS水平的降低, 有益于宿主的炎症减轻。由此提示, PIC改善CKD宿主炎症的作用与其降低血清以及局部组织中IS、PCS水平有关。

4 PIC可抑制肠道菌群合成尿毒素前体, 减轻尿毒素在体内的蓄积

PIC是如何降低宿主体内尿毒素IS水平? 如图4A所示, 吡啶为IS的重要前体物质。食物中的色氨酸在肠道富含色氨酸酶的细菌(如*E. coli*)的作用下生成吡啶^[22], 吡啶进一步在肝脏中合成IS。PIC是否通过抑制IS前体吡啶的合成, 继而抑制宿主体内IS的合成? 本研究采用人粪便中分离的*E. coli*, 将PIC(200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)与*E. coli*共孵8 h, PIC可抑制*E. coli*中吡啶的合成(图4B)。为了进一步确认此结果, 本研究选择了标准*E. coli*菌株ATCC8739, 进行了上述实验的验证。结果与人粪便中分离的*E. coli*结果一致, PIC显著抑制ATCC8739菌株

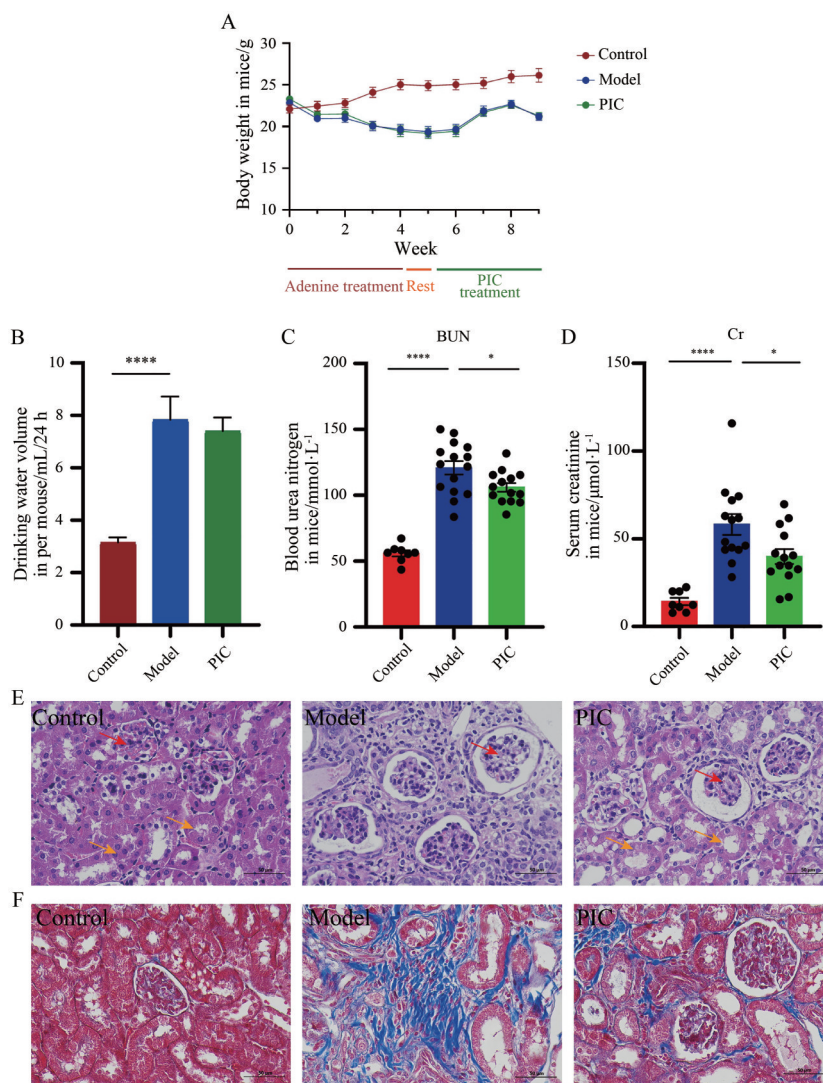


Figure 1 Effect of piceatannol (PIC) on kidney function in chronic kidney disease (CKD) mice. A: Changes in body weight of mice; B: Drinking water volume after PIC treatment; C, D: Blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr) level in serum after PIC treatment, $n = 8-15$; E: Evaluation of renal injury by HE staining, $n = 5$; F: Evaluation of renal fibrosis by Masson staining, $n = 4$. The data were expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$ by Student's t test. Scale bar: 50 μm

吡啉的合成(图4C)。同时,还进行了小鼠粪便混合菌的实验验证。将100、200与400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PIC与粪便混合菌共孵8、12、24 h,结果发现PIC均可显著抑制吡啉的合成。以上结果提示,PIC可显著抑制*E. coli*以及粪便混合菌中吡啉合成(图4D)。

本研究进一步检测了CKD小鼠盲肠内容物及结肠内容物中吡啉的水平。与对照组小鼠相比,腺嘌呤模型小鼠盲肠中吡啉含量降低,而PIC会进一步降低模型小鼠盲肠内吡啉含量;与对照组小鼠相比,腺嘌呤模型小鼠结肠中吡啉含量显著增加,PIC可显著抑制结肠中吡啉合成(图4E)。由此可知:PIC在体内可通过降低IS前体吡啉在结肠的合成,从而减轻IS在CKD模型小鼠中的蓄积。

5 PIC可调控肠道菌群,降低吡啉合成细菌的丰度

肠道微生物是人类健康所必需的共生生态系统^[23],其组成或功能的变化会导致各种疾病。如图4A所示,吡啉的合成是肠道菌群介导的^[24]。为了进一步探究PIC如何抑制尿毒素的合成,本实验将基于肠道菌群,分析PIC对CKD小鼠的作用机制。

5.1 PIC对CKD模型小鼠肠道菌群多样性及丰富度无显著影响

取各组小鼠结肠内容物进行肠道菌群测序。由图5A~C可知,空白组与模型组之间菌群组成存在显著差异;各组之间物种组成丰富度、Shannon指数相近,表明组间物种多样性相似。给药PIC之后,对小鼠结肠内容物中肠道菌群多样性以及丰富度无影响。由图5D~F可知,CKD模型小鼠中厚壁菌门及拟

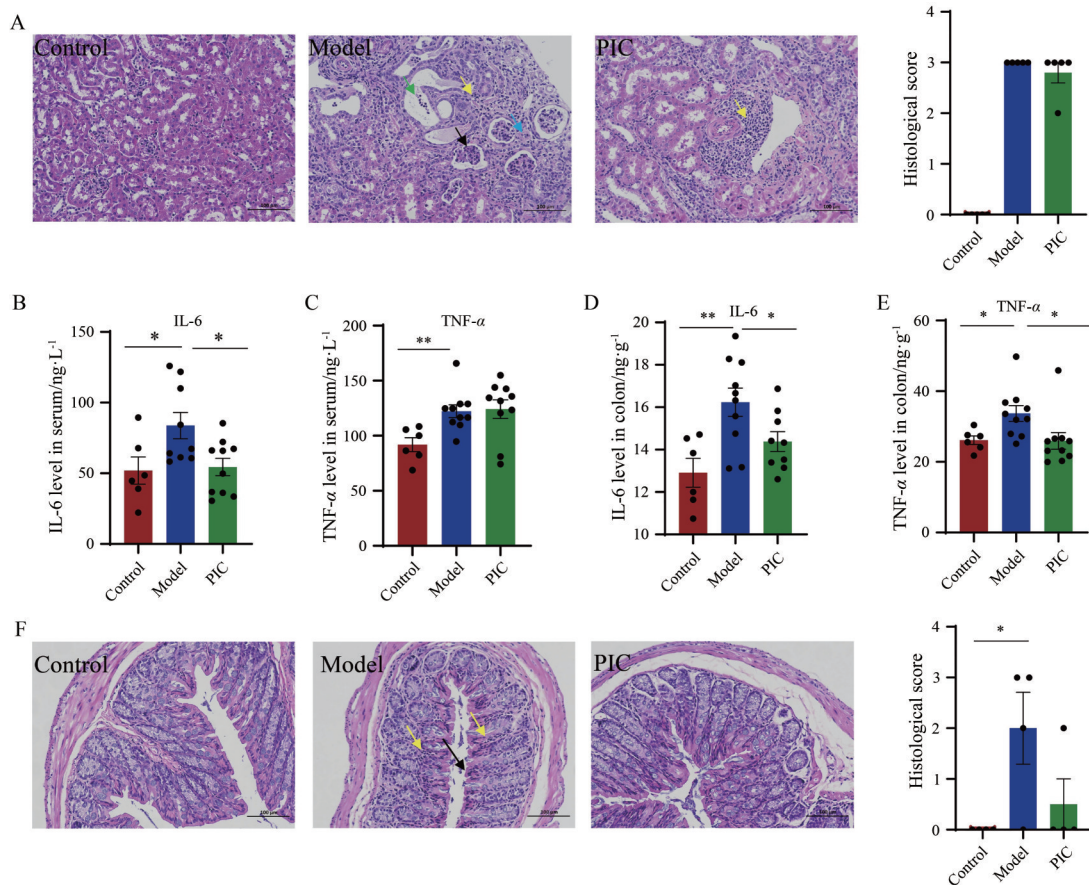


Figure 2 The effect of PIC on host inflammation in CKD mice. A: Evaluation of inflammatory cell infiltration in kidney tissue by HE staining, $n = 5$; B, C: After treatment of PIC, the level of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in serum; D, E: After treatment of PIC, the level of TNF- α and IL-6 in colon tissue, $n = 6-10$. The data in B-E were expressed as mean \pm SEM and analysis by Student's t test; F: Evaluation of inflammatory cell infiltration in colon tissue by H&E staining, $n = 4$. The data in A and F were expressed as means \pm SEM by one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's or Dunnett's multiple-comparisons test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Scale bar: 100 μm

杆菌门细菌丰度有一定的增加趋势,毛螺菌科细菌显著增加,给药PIC之后,并不影响厚壁菌门细菌丰度;但对拟杆菌门细菌及毛螺菌科细菌丰度具有降低趋势。

5.2 PIC可降低具有脲酶、色氨酸酶活性细菌的丰度,降低可合成对甲酚肠道细菌的丰度 在本研究中,发现PIC可显著降低CKD小鼠体内尿素、IS、PCS水平。尿素的分解、IS以及PCS的合成均由肠道菌群介导。尿素可被细菌中的脲酶分解为氨,氨进一步转化为氢氧化铵;氨和氢氧化铵是引起尿毒症患者肠屏障功能和结构破坏的主要介质^[25]。吲哚由肠道中具色氨酸酶的细菌催化食物中色氨酸而得,是尿毒素IS合成的重要前体;对甲酚(*p*-cresol, PC)由肠道细菌催化食物中的酪氨酸而得,PC通过肠道黏膜和肝脏中的磺基转移酶转化为PCS,为PCS合成的重要前体物质^[26]。那么PIC减轻尿毒素在体内的蓄积是否与肠道菌群存在联系?

根据文献报道,某些肠道细菌具有脲酶、色氨

酸酶活性以及可合成对甲酚^[27];本次肠道菌群测序共发现以下具有此类活性的细菌:①具脲酶活性的细菌: Bifidobacteriaceae、Desulfovibrionaceae、Lactobacillaceae、Ruminococcaceae、Rikenellaceae、Porphyromonadaceae;②具有色氨酸酶活性的肠道细菌: Desulfovibrionaceae、Rikenellaceae、Porphyromonadaceae;③可合成对甲酚的肠道细菌: Lactobacillaceae、Clostridia (图6)。

给药PIC后,发现这些肠道细菌的相对丰度均有降低的趋势,提示PIC可通过靶向调控肠道菌群,调控尿毒素在宿主体内的水平,从而降低尿毒素在CKD小鼠体内诱发的炎症水平。

讨论

系统性炎症是CKD及心血管疾病等并发症进展的共同特征。目前针对CKD并发炎症干预措施可分为3类:生活方式改变、药物干预措施和透析优化,但这些措施均存在不足。治疗CKD炎症的药物在患者

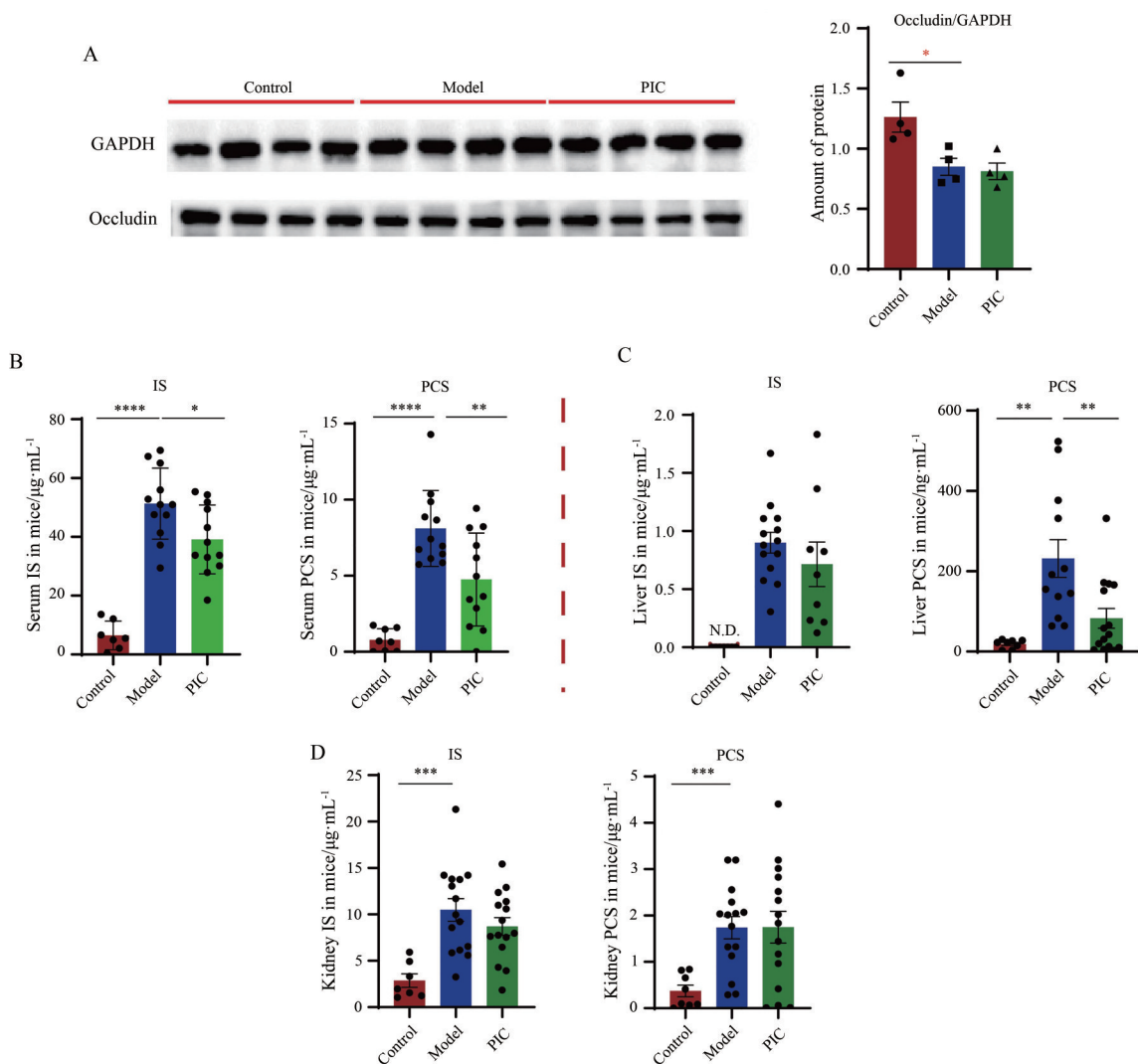


Figure 3 PIC relieves host inflammation by directly inhibiting the level of urinary toxins in the body. A: Determination of occludin protein expression in colon by Western blot, $n = 4$, GAPDH was used as loading control; B: IS and PCS level in serum after 4 weeks PIC treatment; C, D: IS and PCS level in liver and kidney after 4 weeks PIC treatment. $n = 8-15$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ by Student's t test

中试验仍然有限, 需要进一步的研究; 透析优化虽可减轻患者的炎症水平^[28], 但透析本身也会严重影响患者的生活质量等。所以, 研究新的治疗CKD并发炎症的方法显得十分必要。

CKD患者的肠道微生物群发生显著改变, 可导致细菌衍生的尿毒素如IS、PCS和三甲胺-*N*-氧化物(TMAO)的产生增加。这些肠道来源的尿毒素诱导肠上皮屏障破坏, 促进毒素进入体循环, 进而通过炎症、氧化应激和凋亡途径促进多器官功能障碍^[29]。本研究发现, PIC可改善CKD模型小鼠全身炎症水平以及局部结肠组织炎症水平, 显著抑制模型小鼠血清以及肝脏尿毒素IS、PCS水平。IS、PCS是加剧CKD炎症的重要因素^[30]。提示PIC降低CKD小鼠体内尿毒素IS、PCS水平是改善CKD小鼠并发炎症的一种有

效途径。

在此次实验中发现, PIC在体外以及体内均可显著抑制尿毒素IS前体吲哚的合成, 由此推测, 通过降低吲哚的合成, 降低尿毒素IS在体内的水平, 或许是改善CKD并发炎症的一种可行方式。

然而, 2020年《Kidney International》的一篇报道指出^[31], 随着CKD的进展, 患者血液中蛋白结合型尿毒素水平增加, 然而这些尿毒素前体分子(吲哚、对甲酚等)在粪便及尿液中的含量并未增加, 该研究者认为血液中尿毒素水平增加并非由于肠道中细菌对尿毒素前体合成增加。但是, 这项研究缺乏CKD患者及对照组的饮食信息; 饮食对肠道菌群具有极大的影响, 继而影响肠道细菌的代谢产物。CKD患者往往采用低蛋白饮食, 而蛋白水解产物色氨酸及酪氨酸是吲哚及对甲酚的重

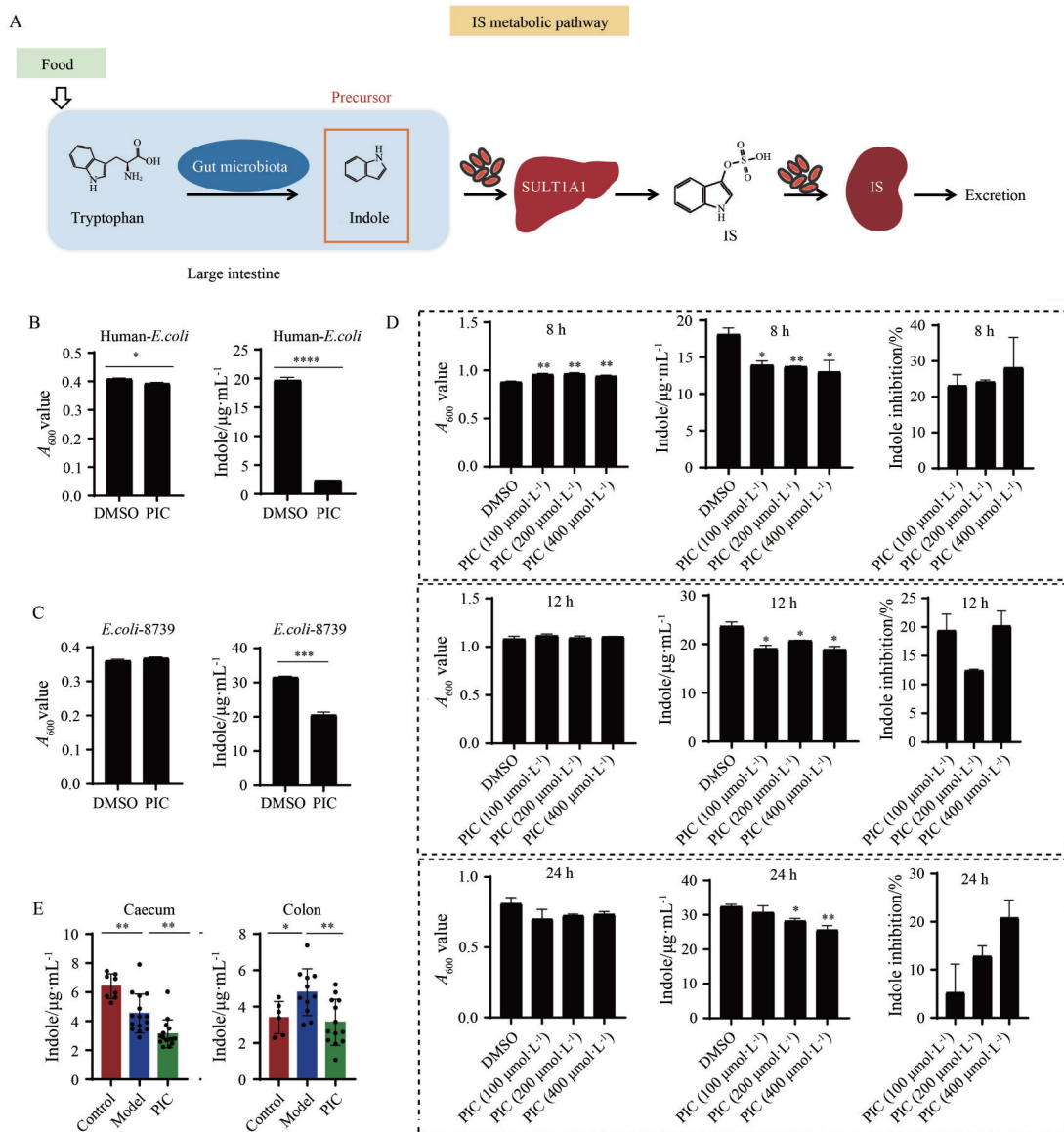


Figure 4 PIC could inhibit the synthesis of IS precursor indole. A: IS metabolic pathway *in vivo*: IS originates from tryptophan in food. Gut microbiota which own abundant tryptophanase (*E. coli*, for example) catalyze tryptophan into indole. Indole is absorbed into the blood, transported to the liver, finally metabolized to IS by liver cytochrome P450 enzyme and sulfotransferase. B, C: Indole concentration in *E. coli* from human feces or ATCC8739 and A_{600} value after co-incubated with 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ PIC for 8 h; D: Indole concentration, indole inhibition in mixed intestinal bacteria culture supernatant and A_{600} value after co-incubated with 100, 200, 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ PIC for 8, 12, 24 h; E: Indole concentration in cecal contents and colon contents of CKD mice after 4 weeks PIC treatment, $n = 6-10$. $n = 3$ (except E), mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ by Student's *t* test

要前体分子,它们会被肠道细菌代谢生成吲哚及对甲酚。因此猜测饮食可能是研究结果出现差异的原因。

而且,本课题组前期研究发现^[32],在CKD模型大鼠肠道内,肠道菌群出现紊乱,吲哚及对甲酚的水平显著高于正常对照大鼠,血液中尿素分子硫酸对甲酚及硫酸吲哚酚水平显著增加,提示肠道中尿素前体分子合成增加可能是血液中尿素水平增加的原因之一。2020年《Science》^[33]的一篇文章也报道,在CKD模型小鼠中,通过硫酸基化修饰色氨酸酶可抑制其活性,减少

体内吲哚的合成,降低CKD小鼠体内Cr以及IS水平,改善肾脏损伤。此现象也证明肠道菌群产生的肾毒性物质与血液中尿素水平有关。

本次研究发现,在CKD模型小鼠中一些公认的益生菌如双歧杆菌和乳酸菌等细菌丰度升高,成为加重肾病的可能致病菌。相关研究发现双歧杆菌、乳酸菌的丰度与尿素IS、PCS及TMAO水平呈正相关,所以其丰度升高可能与尿素在体内的蓄积有关。此外,肾功能不全导致体内有毒物质堆积,黏膜屏障受损

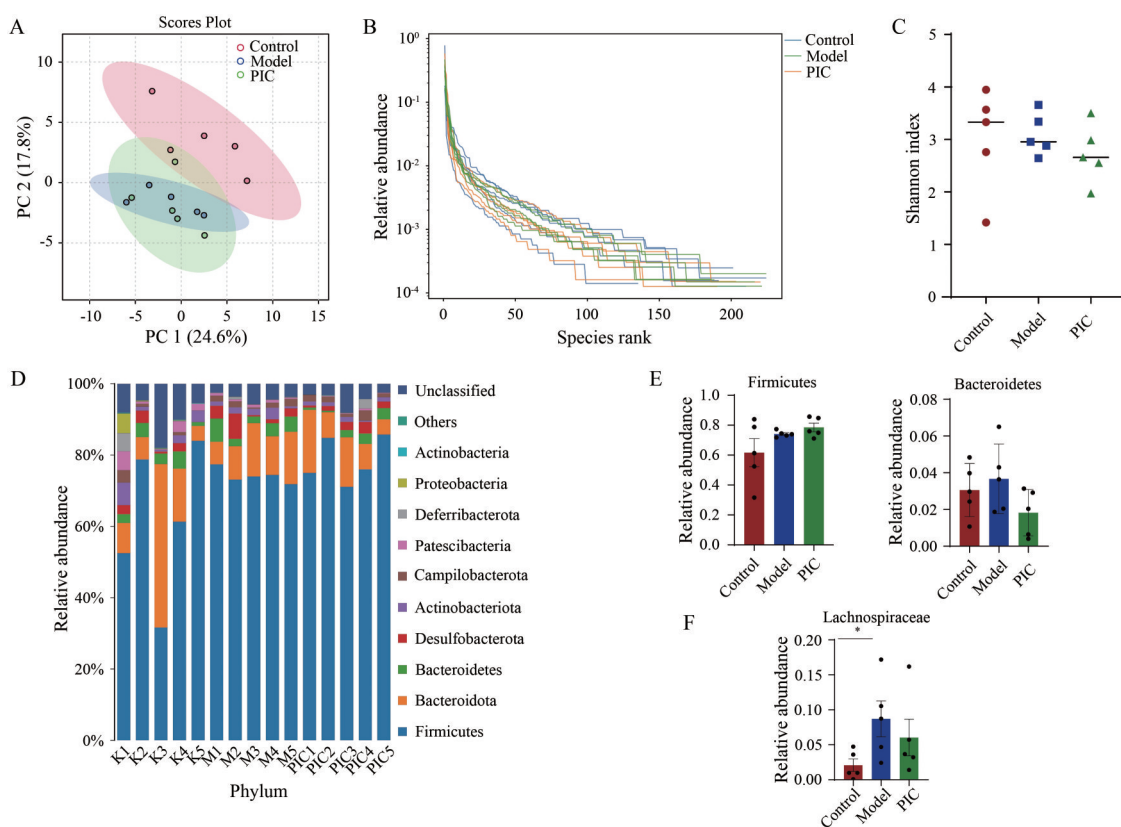


Figure 5 PIC reprograms gut microbiota and inhibits the abundance of Bacteroides. A: Principal component analysis (PCA) of gut microbial communities; B: Rank abundance distribution curve; C: Shannon index; D: Fecal microbiota composition at the phylum level; E: The proportions of Firmicutes and Bacteroidetes; F: The proportions of Lachnospiraceae. $n = 5$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$ by Student's t test

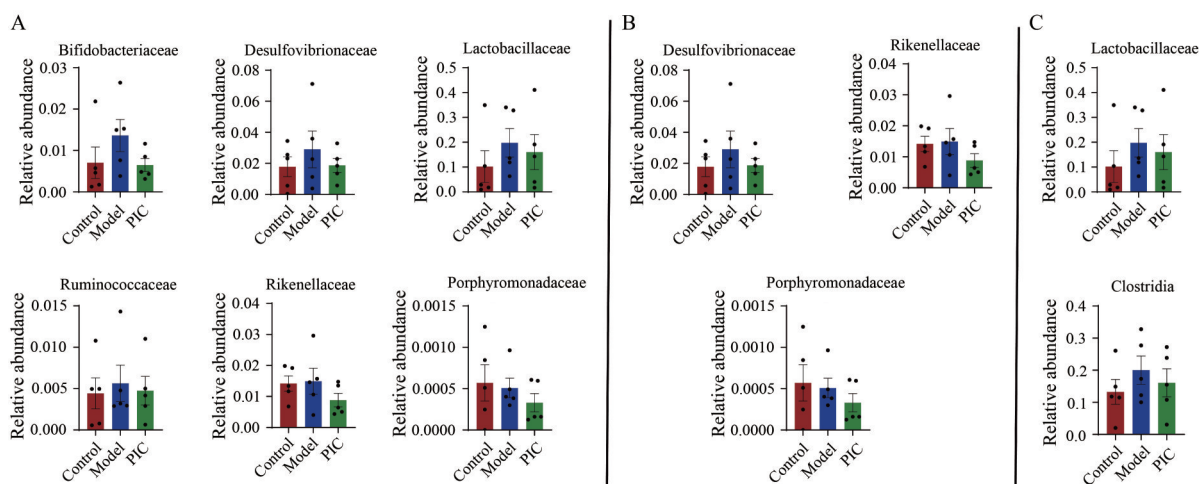


Figure 6 PIC decreases the abundance of bacteria with urease activity, indole-producing and p -cresol-producing bacteria. A: Bacteria with urease activity; B: Indole-producing bacteria; C: p -Cresol-producing bacteria. $n = 5$, mean \pm SEM

及潜在的全身性炎症, 导致细菌的生长环境发生了变化^[34,35]。

Wong 等^[27]的研究发现, CKD 患者肠道菌群出现紊乱, 特别是具有脲酶功能的细菌以及具吲哚和 PC 形成酶的细菌在 CKD 宿主中异常增殖。与文献报道一致, 本研究发现 CKD 模型小鼠具有脲酶功能的细菌以及

具吲哚和 PC 形成酶的细菌丰度升高, 而给药 PIC 后可降低这些细菌的丰度。此结果表明, PIC 可通过调控肠道菌群抑制尿毒素前体的合成, 减轻尿毒素在体内的蓄积。除此之外, 在 CKD 模型小鼠中, 本研究也发现了一些丰度降低的细菌, 如拟杆菌科、Muribaculaceae 科、Prevotellaceae 科及 Eggerthellaceae 科等。以上结

果表明: 与尿毒素合成相关的细菌在CKD小鼠中丰度升高; 而部分细菌相对丰度呈降低趋势。

综上所述, 本研究发现PIC可改善CKD小鼠体内的炎症水平, 这与PIC报道的具有较强的抗炎作用一致。本研究进一步发现PIC可调控CKD模型小鼠的肠道菌群, 抑制具脲酶、色氨酸酶活性肠道细菌的丰度, 抑制合成对甲酚肠道细菌的丰度, 降低体内尿素的分解以及降低体内吲哚、PC的合成, 继而改善宿主体内尿毒素的蓄积, 最终达到改善炎症的目的。本研究证实, PIC可改善CKD小鼠的并发炎症, 也为CKD患者并发的炎症提供了一种新颖的治疗策略。

作者贡献: 李成曦为本文主要撰写者; 王颖异、王雨萌及杨淑惠负责肠道细菌体外厌氧培养实验; 尹佳婷及刘云负责肠道菌群数据分析; 段金彪为本文提供修改意见; 郭建明提出本文思路并参与文章撰写与修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Ammirati AL. Chronic kidney disease [J]. Rev Assoc Med Bras, 2020, 66: 3-9.
- [2] Peng Y, Xun XX, Li JP, et al. Strategy to delay the progression of chronic kidney disease by targeting gut microbiota and uremic toxins metabolism pathway [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2021, 56: 37-49.
- [3] Akchurin OM, Kaskel F. Update on inflammation in chronic kidney disease [J]. Blood Purif, 2015, 39: 84-92.
- [4] Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, et al. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients [J]. Kidney Int, 1999, 55: 648-658.
- [5] Mihai S, Codrici E, Popescu ID, et al. Inflammation-related mechanisms in chronic kidney disease prediction, progression, and outcome [J]. J Immunol Res, 2018, 2018: 2180373.
- [6] Vaziri ND, Yuan J, Rahimi A, et al. Disintegration of colonic epithelial tight junction in uremia: a likely cause of CKD-associated inflammation [J]. Nephrol Dial Transplant, 2012, 27: 2686-2693.
- [7] Vaziri ND, Goshtasbi N, Yuan J, et al. Uremic plasma impairs barrier function and depletes the tight junction protein constituents of intestinal epithelium [J]. Am J Nephrol, 2012, 36: 438-443.
- [8] Lekawanvijit S, Adrahtas A, Kelly DJ, et al. Does indoxyl sulfate, a uraemic toxin, have direct effects on cardiac fibroblasts and myocytes? [J]. Eur Heart J, 2010, 31: 1771-1779.
- [9] Azevedo ML, Bonan NB, Dias G, et al. *p*-Cresyl sulfate affects the oxidative burst, phagocytosis process, and antigen presentation of monocyte-derived macrophages [J]. Toxicol Lett, 2016, 263: 1-5.
- [10] Vastano BC, Chen Y, Zhu N, et al. Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum* [J]. J Agric Food Chem, 2000, 48: 253-256.
- [11] Li H, Shi Y, Wang X, et al. Piccatannol alleviates inflammation and oxidative stress *via* modulation of the Nrf2/HO-1 and NF- κ B pathways in diabetic cardiomyopathy [J]. Chem Biol Interact, 2019, 310: 108754.
- [12] Wahdan SA, Azab SS, Elsherbiny DA, et al. Piccatannol protects against cisplatin nephrotoxicity *via* activation of Nrf2/HO-1 pathway and hindering NF- κ B inflammatory cascade [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2019, 392: 1331-1345.
- [13] Islam S, Hassan F, Mu MM, et al. Piccatannol prevents lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) production and nuclear factor (NF)- κ B activation by inhibiting I κ B kinase (IKK) [J]. Microbiol Immunol, 2004, 48: 729-736.
- [14] Rahman A, Yamazaki D, Sufiun A, et al. A novel approach to adenine-induced chronic kidney disease associated anemia in rodents [J]. PLoS One, 2018, 13: e0192531.
- [15] Amdur RL, Feldman HI, Gupta J, et al. Inflammation and progression of CKD: the CRIC study [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2016, 11: 1546-1556.
- [16] Michielan A, D'Inca R. Intestinal permeability in inflammatory bowel disease: pathogenesis, clinical evaluation, and therapy of leaky gut [J]. Mediators Inflamm, 2015, 2015: 628157.
- [17] Zhang S, Xu W, Wang H, et al. Inhibition of CREB-mediated ZO-1 and activation of NF- κ B-induced IL-6 by colonic epithelial MCT4 destroys intestinal barrier function [J]. Cell Prolif, 2019, 52: e12673.
- [18] Kuo WT, Shen L, Zuo L, et al. Inflammation-induced occludin downregulation limits epithelial apoptosis by suppressing caspase-3 expression [J]. Gastroenterology, 2019, 157: 1323-1337.
- [19] Gondouin B, Cerini C, Dou L, et al. Indolic uremic solutes increase tissue factor production in endothelial cells by the aryl hydrocarbon receptor pathway [J]. Kidney Int, 2013, 84: 733-744.
- [20] Kimura A, Naka T, Nohara K, et al. Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105: 9721-9726.
- [21] Poveda J, Sanchez-Niño MD, Glorieux G, et al. *p*-Cresyl sulphate has pro-inflammatory and cytotoxic actions on human proximal tubular epithelial cells [J]. Nephrol Dial Transplant, 2014, 29: 56-64.
- [22] Liu WC, Tomino Y, Lu KC. Impacts of indoxyl sulfate and *p*-cresol sulfate on chronic kidney disease and mitigating effects of AST-120 [J]. Toxins (Basel), 2018, 10: 367.
- [23] Gao XJ, Li T, Wei B, et al. Regulatory mechanisms of gut microbiota on intestinal CYP3A and P-glycoprotein in rats with dextran sulfate sodium-induced colitis [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 34-43.
- [24] Wang YY, Li JP, Lu JP, et al. Effect and mechanism of Huangkui capsule on reduction of uremic toxin accumulation in an animal model of chronic kidney disease [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2019, 54: 2267-2276.

- [25] Vaziri ND, Yuan J, Norris K. Role of urea in intestinal barrier dysfunction and disruption of epithelial tight junction in chronic kidney disease [J]. *Am J Nephrol*, 2013, 37: 1-6.
- [26] Lee JH, Yun CW, Hur J, et al. Fucoidan rescues *p*-cresol-induced cellular senescence in mesenchymal stem cells *via* FAK-Akt-TWIST axis [J]. *Mar Drugs*, 2018, 16: 121-136.
- [27] Wong J, Piceno YM, DeSantis TZ, et al. Expansion of urease- and uricase-containing, indole- and *p*-cresol-forming and contraction of short-chain fatty acid-producing intestinal microbiota in ESRD [J]. *Am J Nephrol*, 2014, 39: 230-237.
- [28] Santoro A, Mancini E. Is hemodiafiltration the technical solution to chronic inflammation affecting hemodialysis patients? [J]. *Kidney Int*, 2014, 86: 235-237.
- [29] Lau WL, Savoj J, Nakata MB, et al. Altered microbiome in chronic kidney disease: systemic effects of gut-derived uremic toxins [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2018, 132: 509-522.
- [30] Lu JB, Wang YY, Zhang S, et al. Huang-Kui-Si-Wu Formula decreases uremic toxin production by modulating intestinal microbial metabolic pathways [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 1229-1236.
- [31] Gryp T, De Paepe K, Vanholder R, et al. Gut microbiota generation of protein-bound uremic toxins and related metabolites is not altered at different stages of chronic kidney disease [J]. *Kidney Int*, 2020, 97: 1230-1242.
- [32] Liu Y, Li JP, Yu JG, et al. Disorder of gut amino acids metabolism during CKD progression is related with gut microbiota dysbiosis and metagenome change [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 149: 425-435.
- [33] Lobel L, Cao YG, Fenn K, et al. Diet posttranslationally modifies the mouse gut microbial proteome to modulate renal function [J]. *Science*, 2020, 369: 1518-1524.
- [34] Li Y, Su X, Zhang L, et al. Dysbiosis of the gut microbiome is associated with CKD5 and correlated with clinical indices of the disease: a case-controlled study [J]. *J Transl Med*, 2019, 17: 228.
- [35] Hsu CN, Lu PC, Hou CY, et al. Blood pressure abnormalities associated with gut microbiota-derived short chain fatty acids in children with congenital anomalies of the kidney and urinary tract [J]. *J Clin Med*, 2019, 8: 1090-1102.