

本文引用: 胡锦涛, 蒋士生, 牛俊杰. 芪连结肠宁对溃疡性结肠炎模型大鼠 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路及肠道菌群的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(9): 1442-1450.

# 芪连结肠宁对溃疡性结肠炎模型大鼠 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路及肠道菌群的影响

胡锦涛, 蒋士生\*, 牛俊杰\*

(湖南省中西医结合医院, 湖南 长沙 410006)

**[摘要]** **目的** 基于肠道菌群及 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路探讨芪连结肠宁治疗溃疡性结肠炎的可能作用机制。**方法** 健康雄性 2 个月龄 SD 大鼠 40 只, 随机分为正常组、模型组、芪连结肠宁低剂量组、芪连结肠宁中剂量组及芪连结肠宁高剂量组, 每组 8 只。采用 5% 葡聚糖硫酸钠喂养建立溃疡性结肠炎大鼠模型, 连续治疗 3 周后检测指标。给药前后进行疾病活动指数(disease activity index, DAI)评分, HE 染色观察结肠组织病理情况, 免疫组织化学法观察结肠组织核因子  $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)p65、Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)蛋白表达情况, ELISA 法测定血清中 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、白介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )蛋白含量, 实时荧光定量 PCR 检测结肠组织 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA 的表达, 16S rRNA 检测大鼠粪便中肠道菌群的多样性及分布情况。**结果** 与正常组比较, 模型组大鼠肠道出现明显的病理损伤, DAI 评分明显升高( $P<0.01$ ), 血清及结肠组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、TLR4、NF- $\kappa$ B p65 蛋白含量及 mRNA 表达均明显增加( $P<0.01$ ), 肠道菌群多样性及丰度均明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), Bacteroidota、Campilobacterota 菌门和 *Prevotella* 菌属均明显增加( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), Firmicutes、Spirochaetota 菌门和 norank\_f\_Muribaculaceae、*Lactobacillus* 菌属均明显减少( $P<0.01$ )。与模型组比较, 芪连结肠宁各剂量组大鼠肠道病理损伤不同程度减轻, DAI 评分均明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 血清及结肠组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、TLR4、NF- $\kappa$ B p65 蛋白含量及 mRNA 表达均明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 芪连结肠宁中剂量组肠道菌群多样性及丰度均明显增加( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。**结论** 芪连结肠宁可有效缓解溃疡性结肠炎模型大鼠结肠组织病理损伤, 增加肠道菌群多样性及丰富度, 调控肠道菌群物种分布, 介导 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路, 减轻炎症反应。

**[关键词]** 溃疡性结肠炎; 芪连结肠宁; 肠道菌群; 炎症; Toll 样受体 4; 核因子  $\kappa$ B

**[中图分类号]** R259

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.09.005

## Effects of Qilian Jiechang Ning on TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway and intestinal flora in ulcerative colitis model of rats

HU Jinyang, JIANG Shisheng\*, NIU Junjie\*

(Affiliated Hospital of Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the possible mechanism of Qilian Jiechang Ning in the treatment of ulcerative colitis based on intestinal flora and TLR4/NF- $\kappa$ B pathway. **Methods** Forty healthy male 2-month-old SD rats were randomly divided into a normal group, a model group, a low-dose Qilian Jiechang Ning group, a middle-dose Qilian Jiechang Ning group, and a high-dose Qilian Jiechang Ning group, with 8 rats in each group. A rat model of ulcerative colitis was established by feeding with 5% dextran sodium sulfate, and the indexes were detected after continuous treatment for 3 weeks. Disease activity

**[收稿日期]** 2022-07-07

**[基金项目]** 湖南省中医药科研计划青年课题(2021177); 湖南省中医药研究院联合基金重点项目(202118); 湖南省中医药研究院青年基金项目(201922); 全国名老中医药专家蒋士生传承工作室建设项目(国中医药人教函[2012]149)。

**[第一作者]** 胡锦涛, 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 中医药防治消化系统疾病的临床与基础研究。

**[通信作者]** \* 牛俊杰, 男, 硕士, 主治医师, E-mail: 563649472@qq.com; 蒋士生, 男, 教授, 博士研究生导师, E-mail: 664210847@qq.com。

index (DAI) score was performed before and after administration; HE staining was used to observe the pathological condition of colon; immunohistochemistry was used to observe nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p65 and Toll-like receptor 4 (TLR4) in colon tissue protein expression; TLR4, NF- $\kappa$ B p65, interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) protein content in serum were determined by ELISA; TLR4, NF- $\kappa$ B p65, IL-6, TNF- $\alpha$  mRNA expression levels of colon tissue were detected by real-time fluorescence quantitative PCR; 16S rRNA was used to detect the diversity and distribution of intestinal flora in rat feces.

**Results** Compared with the normal group, the rats in the model group had obvious pathological damage to the intestine; the DAI score was significantly increased ( $P<0.01$ ); the protein and mRNA expression levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, TLR4, NF- $\kappa$ B p65 in serum and colon tissue were increased ( $P<0.01$ ); the diversity and abundance of intestinal flora were significantly decreased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); Bacteroidota, Campilobacterota and *Prevotella* were significantly increased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); Firmicutes, Spirochaetota, norank\_f\_Muribaculaceae and *Lactobacillus* were significantly decreased ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the intestinal pathological damage of the rats in each dose group of Qilian Jiechang Ning was alleviated to different degrees, and the DAI score was significantly decreased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). The protein content and mRNA expression of TLR4, IL-6, TLR4, NF- $\kappa$ B p65 in serum and colon tissues were decreased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); the diversity and abundance of intestinal flora in the middle-dose Qilian Jiechang Ning group were increased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion** Qilian Jiechang Ning can effectively alleviate the pathological damage of colon tissue in ulcerative colitis model rats, increase the diversity and abundance of intestinal flora, regulate the distribution of intestinal flora species, and mediate TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway to reduce inflammatory response.

[**Keywords**] ulcerative colitis; Qilian Jiechang Ning; intestinal flora; inflammation; Toll-like receptor 4; nuclear factor- $\kappa$ B

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种机制不明的炎性肠病,极易复发,常迁延难愈<sup>[1]</sup>。近年来病理生理学概念认识到肠道菌群在UC发生发展进程中扮演重要角色,对UC患者粪便进行菌群检测证实存在明显肠道菌群失调,其生物多样性及丰度减少,肠道菌群失调与肠道炎症相关疾病密切相关<sup>[2]</sup>。肠道菌群可通过Toll样受体的介导过程上调抗炎细胞因子和减少促炎细胞因子,进而调控肠道黏膜免疫系统<sup>[3]</sup>;同时,正常的肠道菌群可与肠黏膜结合形成生物屏障,拮抗病原微生物及肠毒素的入侵。芪连结肠宁有益气健脾、清热祛湿的功效,由全国名老中医药专家蒋士生教授所创,对于UC的治疗收效甚好。本研究旨在通过检测UC模型大鼠血清及结肠组织中Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)、核因子 $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)p65、白介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )的表达和粪便中肠道菌群多样性及优势物种丰度,探讨芪连结肠宁治疗UC的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

SPF级雄性SD大鼠40只,体质量160~200g,购自湖南斯莱克景达实验动物中心,许可证号:SYXK(湘)2021-0008。饲养条件:昼夜各12h明暗

交替,室温22~28℃,相对湿度60%,噪声 $\leq$ 80dB。实验动物饲养于湖南中医药大学动物实验中心,并完成相关伦理审查,动物实验伦理审查号:2021-0088。

### 1.2 主要药物、试剂及仪器

芪连结肠宁组成:黄芪15g、人参15g、炒白术15g、茯苓15g、陈皮10g、黄连10g、干姜6g、蒲黄10g、蒲公英15g、败酱草15g、椿皮10g、木香10g、白芍15g、甘草5g,药物浸泡于蒸馏水中40min,第一煎大火煮沸后,小火煎煮30min;第二煎大火煮沸后,小火煎煮20min,最后将2次煎煮汤药混合浓缩制成含生药2.48g/mL的药液。所有中药材均购于湖南省中西医结合医院中药房,4℃冰箱中保存,使用前预热。

TRIzol试剂(美国Thermo公司,批号:10296010);兔IgG-免疫组织化学试剂盒、HRP-羊抗兔IgG、抗GAPDH抗体均购自武汉博士德公司(批号分别为15H-1L16F0334、BST15H06A15H65、BST14H06A18G11);抗NF- $\kappa$ B p65抗体、抗TLR4抗体均购自英国Abcam公司(批号分别为ab22048、ab32536);NF- $\kappa$ B p65、TLR4、IL-6、TNF- $\alpha$  ELISA试剂盒均购自美国Proteintech公司(批号分别为55030、55131、53027、55011);伊红染液、苏木素染液均购自武汉赛维尔生物科技有限公司(批号分别为ZH201285、ZH209148)。

超微分光光度计(美国Thermo公司,型号:

Nanodrop200);实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司,型号:CFX96);石蜡切片机(德国徕卡公司,型号:RM2235);BX43 光学显微镜(日本 Olympus 公司,型号:IX73-U);多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司,型号:SpectraMax5);高速冷冻离心机(日本日立公司,型号:CR22G II)。

### 1.3 动物分组与造模

采用随机数字表法将 40 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、芪连结肠宁低剂量组、芪连结肠宁中剂量组及芪连结肠宁高剂量组,每组 8 只。参照文献[4],模型组和芪连结肠宁各剂量组大鼠均采用 5%葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)喂养,即用蒸馏水配制浓度为 5%的 DSS 溶液,然后放入饮水瓶中自由饮用 7 d 以建立 UC 大鼠模型。正常组大鼠常规饲养。造模第 7 天随机选取 2 只大鼠处死,以疾病活动指数(disease activity index, DAI)评分升高及结肠黏膜出现损伤表示造模成功<sup>[5]</sup>。体质量降低率、大便性状、便血情况根据各自严重程度,均计 0~4 分,评分越高,程度越严重。DAI=(体质量下降率分数+大便性状分数+便血情况分数)/3。

### 1.4 干预方法及 DAI 测定

造模结束后第 2 天起开始灌胃给药。根据人临床用量的等效剂量和动物体表面积计算<sup>[6]</sup>,芪连结肠宁低、中、高剂量组每次分别给予含生药为 1.24、2.48、4.96 g/kg 的浓度灌胃,空白组、模型组均以 2 mL 生理盐水灌胃,以上各组灌胃均为 2 次/d,连续 3 周。分别于给药前及给药后观察大鼠体质量变化,进食、活动及粪便情况,根据体质量下降、粪便性状和隐血情况,计算 DAI。

### 1.5 HE 染色观察结肠组织形态

末次灌胃结束后,各组大鼠注射戊巴比妥钠(0.5 mg/kg)麻醉后断颈法处死,以生理盐水行心脏

灌注,快速取结肠组织(8~10 cm),生理盐水洗净,滤纸吸干水分,一部分放入 4%多聚甲醛中固定,石蜡包埋,切片,苏木素、伊红染色,镜下观察结肠组织形态。另一部分结肠组织液氮速冻,然后于-80℃冰箱中保存用于后续检测。

### 1.6 免疫组织化学法观察结肠组织 NF- $\kappa$ B p65、TLR4 蛋白表达情况

取部分结肠组织石蜡切片脱蜡水化。3%过氧化氢溶液封闭 10 min,消除内源性过氧化物酶,微波抗原修复后,5% BSA 封闭 30 min。一抗 4℃(1:200)孵育过夜,二抗室温(1:200)孵育 30 min,DBA 显色。光学显微镜下观察。结果通过 Image-Pro Plus 6.0 对 NF- $\kappa$ B、TLR4 的平均光密度(optical density, OD)值进行半定量分析。

### 1.7 ELISA 法测定血清中 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、IL-6、TNF- $\alpha$ 蛋白含量

行心脏灌注前,腹主动脉取血,4℃静置 4 h,4℃、3500 r/min,离心半径 13.5 cm,离心 10 min,取上清液。严格按照 ELISA 试剂盒说明书中的步骤进行标准品制备、加样、孵育等操作,加入终止液后用酶标仪在 450 nm 波长处检测每孔 OD 值。通过标准曲线计算每个样品蛋白水平。

### 1.8 实时荧光定量 PCR 检测结肠组织 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、IL-6、TNF- $\alpha$ mRNA 的表达

采用 TRIzol 试剂提取结肠组织细胞总 RNA,紫外分光光度计检测 RNA 的质量和浓度。参照逆转录试剂盒说明,进行逆转录,然后进行 PCR 扩增。反应程序:95℃预变性 2 min;95℃变性 30 s;58℃退火 30 s;72℃延伸 30 s;40 个循环,溶解曲线 60~95℃测溶解曲线,得出内参及各指标 Ct 值。引物由南京诺唯赞生物科技有限公司合成,引物序列详见表 1。根据相对定量法  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算出 mRNA 的相对表达量。

表 1 RT-qPCR 引物序列

基因	正向序列	反向序列	引物长度/bp
GAPDH	CAAGGCTGAGAATGGGAAGC	GAAGACGCCAGTAGACTCCA	127
MUC-2	CAAACCGTGCAAAGCTGAAC	CTTGGGCACACAGGAGTAGA	118
TFF3	GCAAATGTCAGGGTGGACTG	TCTTGCAGAGGTTGAAGCAC	231
TLR4	TTATCCAGAGCCGTTGGTGT	CCCCTCGAGGTAGGTGTTT	203
NF- $\kappa$ B	CCAAGTACCCGGATACAGCA	ACACAGTCATCGTAGGGCAA	113
IL-6	CCCAACTTCCAATGCTCTCC	AGGTTTGCCGAGTAGACCTC	229
TNF- $\alpha$	CGTCGTAGCAAACCACCAAG	CCCTTGAAGAGAACCTGGGA	167

## 1.9 16S rRNA 检测大鼠粪便中肠道菌群的多样性及分布情况

末次灌胃给药结束后无菌采集各组大鼠的直肠段内容物于冻存管中,立即存放至液氮中,2 h 后取出干冰运送至上海美吉生物医药公司,进行 16S rRNA 基因测序检测。根据序列间的相似性(通常为 97%)将序列进行聚类,分成多个操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU),随后进行物种注释以简化工作量,提高分析的准确率与效率。Alpha 多样性分析反映的是肠道微生物群落丰度和多样性,主要有 Sobs、Chao、Ace、Shannon 及 Simpson 5 种衡量指数。Sobs、Chao 和 Ace 是生态学中评估群落丰度的指数,Shannon 和 Simpson 是用来估算群落多样性的指数<sup>[7]</sup>。

### 1.10 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。数据均满足正态分布,计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,组间比较采用单因素方差分析,若方差齐,采用 LSD 法;方差不齐,采用 Dunnett's T3 作组间多重比较。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠 DAI 评分情况

与正常组比较,模型组给药前后 DAI 评分均明显升高( $P<0.01$ )。与给药前比较,芪连结肠宁各剂量组 DAI 评分均明显降低( $P<0.05, P<0.01$ )。给药后,芪连结肠宁各剂量组 DAI 评分均明显低于模型组( $P<0.05, P<0.01$ ),芪连结肠宁低剂量组 DAI 评分明显高于芪连结肠宁中剂量组( $P<0.05$ );芪连结肠宁高剂量组与芪连结肠宁低剂量组 DAI 评分比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );芪连结肠宁高剂量组与芪连结肠宁中剂量组间 DAI 评分比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。详见表 2。

表 2 各组大鼠 DAI 评分比较( $\bar{x}\pm s$ ,分, $n=8$ )

组别	给药前	给药后
正常组	0.11±0.16	0.09±0.12
模型组	3.18±0.40 <sup>▲▲</sup>	2.95±0.23 <sup>▲▲</sup>
芪连结肠宁低剂量组	3.21±0.67	2.06±0.30 <sup>*#△</sup>
芪连结肠宁中剂量组	3.09±0.59	1.17±0.27 <sup>*##</sup>
芪连结肠宁高剂量组	3.16±0.53	1.66±0.25 <sup>*##</sup>

注:与正常组比较,▲ $P<0.05$ ,▲▲ $P<0.01$ ;与模型组比较,\* $P<0.05$ ,## $P<0.01$ ;与芪连结肠宁中剂量组比较,△ $P<0.05$ ,△△ $P<0.01$ ;与给药前比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ 。

### 2.2 各组大鼠结肠组织病理改变情况

正常组小鼠结肠组织结构正常,腺体排列整齐,黏膜上皮组织完整,黏液层正常;模型组小鼠结肠组织结构异常,黏膜表面出现缺损,黏液层部分丢失,大量炎细胞聚集、浸润,腺体破坏甚至丢失。芪连结肠宁各剂量组结肠组织病理改变不同程度恢复,黏膜腺体排列较整齐,肠壁基本恢复,炎性细胞浸润减轻。详见图 1。

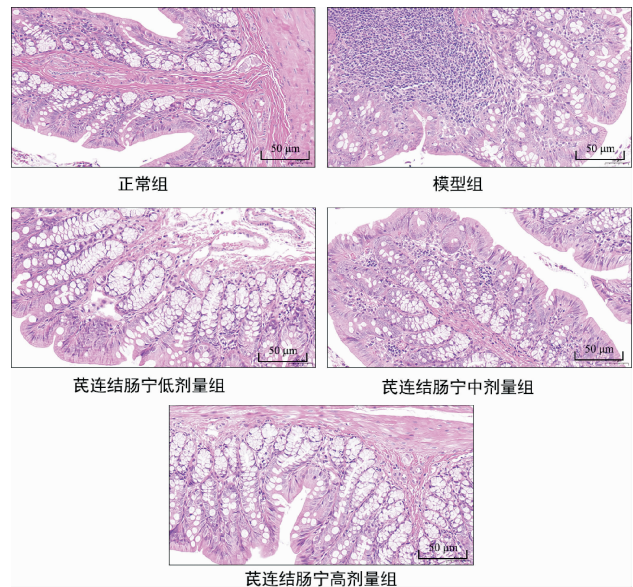


图 1 各组大鼠结肠组织 HE 染色结果

### 2.3 各组大鼠结肠组织中 NF-κB p65、TLR4 蛋白表达情况比较

与正常组比较,模型组 NF-κB p65、TLR4 蛋白表达均明显增加( $P<0.01$ )。与模型组比较,芪连结肠宁各剂量组 NF-κB p65、TLR4 蛋白表达均明显减少( $P<0.05, P<0.01$ )。与芪连结肠宁中剂量组比较,芪连结肠宁高剂量组 TLR4 蛋白和芪连结肠宁低剂量组 NF-κB、TLR4 蛋白表达均明显增加( $P<0.05$ )。芪连结肠宁低剂量组与芪连结肠宁高剂量组间 NF-κB p65、TLR4 蛋白表达比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。详见图 2。

### 2.4 各组大鼠血清中 TNF-α、IL-6、TLR4、NF-κB p65 蛋白含量比较

与正常组比较,模型组 TNF-α、IL-6、TLR4、NF-κB p65 蛋白含量均明显增加( $P<0.01$ )。与模型组比较,芪连结肠宁各剂量组 TNF-α、IL-6、TLR4、NF-κB p65 蛋白含量均明显降低( $P<0.05, P<0.01$ )。与芪连结肠宁中剂量组比较,芪连结肠宁低剂量组、芪连结肠宁高剂量组 TNF-α、IL-6、TLR4、NF-κB

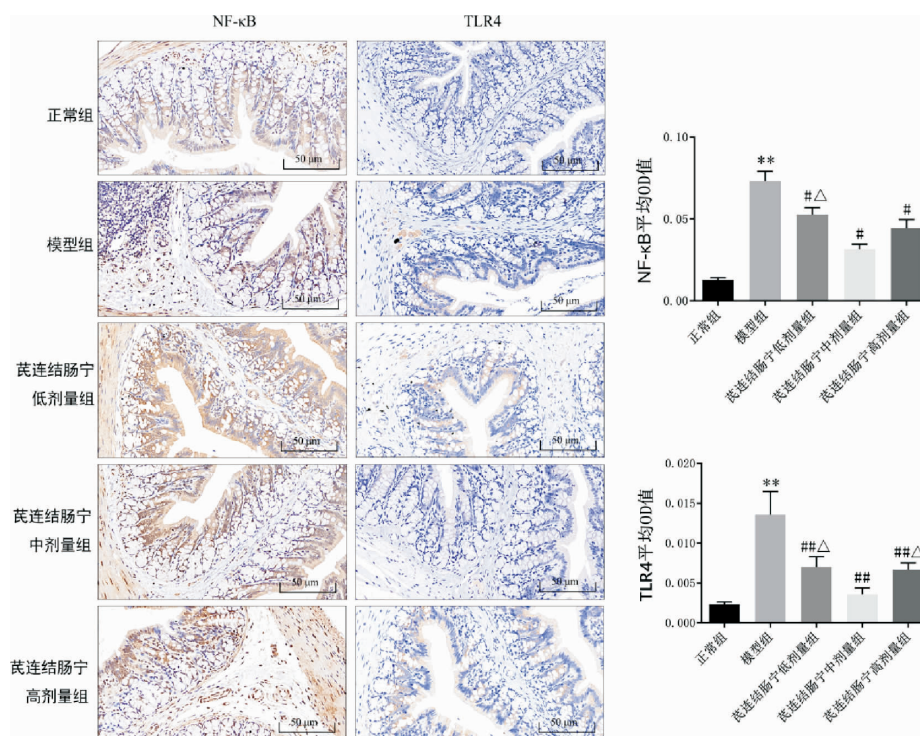


图 2 各组大鼠结肠组织 NF-κB p65、TLR4 蛋白表达情况(免疫组织化学法, n=8)

注:与正常组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$ ;与芪连结肠宁中剂量组比较,Δ $P<0.05$ ,ΔΔ $P<0.01$ 。

p65 蛋白含量均明显增加( $P<0.05, P<0.01$ )。芪连结肠宁低剂量组与芪连结肠宁高剂量组间 TNF-α、IL-6、TLR4、NF-κB p65 蛋白含量比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。详见表 3。

### 2.5 各组大鼠结肠组织 TLR4、NF-κB p65、IL-6、TNF-α mRNA 表达情况

与正常组比较,模型组 TLR4、NF-κB p65、IL-6、TNF-α mRNA 表达均明显增加( $P<0.01$ )。与模型组比较,芪连结肠宁低剂量组 IL-6 mRNA 和芪连结肠宁中剂量组、芪连结肠宁高剂量组 TLR4、NF-κB p65、IL-6、TNF-α mRNA 表达均明显降低( $P<0.05, P<0.01$ ),芪连结肠宁低剂量组 TNF-α mRNA 表达明显增加( $P<0.05$ )。与芪连结肠宁中剂量组比较,芪连结肠宁低剂量组 TLR4、NF-κB p65、IL-6、TNF-α mRNA 和芪连结肠宁高剂量组 TLR4、NF-κB p65

mRNA 表达均明显增加( $P<0.01$ )。芪连结肠宁低剂量组与模型组间 TLR4、NF-κB p65 mRNA 表达比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。芪连结肠宁高剂量组与芪连结肠宁中剂量组间 IL-6、TNF-α mRNA 表达比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。详见表 4。

### 2.6 各组大鼠肠道菌群多样性分析

2.6.1 各组大鼠肠道微生物整体信息及 OTU 组成 完成 25 个样本的多样性数据分析,其中包括正常组、模型组、芪连结肠宁低剂量组、芪连结肠宁中剂量组、芪连结肠宁高剂量组各 5 个样本,共获得优化序列 1 643 539 个,平均序列长度 417 bp。OTU 序列相似度为 0.97,共获得 876 个 OTU。

2.6.2 Alpha 多样性分析 此次测序发现统计 OTU 覆盖率均大于 99.00%以上,说明本次测序结果代表样本的真实情况,可以进行下一步分析。与正常组相

表 3 各组大鼠血清中 TNF-α、IL-6、TLR4、NF-κB p65 蛋白含量比较( $\bar{x}\pm s$ , pg/mL, n=8)

组别	TNF-α	IL-6	TLR4	NF-κB p65
正常组	55.51±14.64	62.34±11.20	2.95±1.07	7.14±1.22
模型组	369.09±50.80**	376.36±11.19**	71.76±6.38**	88.23±6.35**
芪连结肠宁低剂量组	254.32±30.39#ΔΔ	322.29±11.83##ΔΔ	55.84±4.61##ΔΔ	60.74±5.68##ΔΔ
芪连结肠宁中剂量组	110.33±21.59##	163.28±6.16##	25.19±7.70##	20.32±1.66##
芪连结肠宁高剂量组	169.78±26.14##ΔΔ	224.98±24.39##Δ	42.78±6.18##Δ	41.89±4.51##ΔΔ

注:与正常组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$ ;与芪连结肠宁中剂量组比较,Δ $P<0.05$ ,ΔΔ $P<0.01$ 。

表4 各组大鼠结肠组织中TLR4、NF-κB p65、IL-6、TNF-α mRNA表达情况比较( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	TLR4	NF-κB p65	IL-6	TNF-α
正常组	1.13±0.29	1.09±0.31	1.04±0.09	1.24±0.34
模型组	6.75±1.10**	33.73±3.80**	31.97±2.15**	33.32±9.80**
芪連結肠宁低剂量组	7.89±0.66 <sup>△△</sup>	35.50±2.82 <sup>△△</sup>	21.71±1.81 <sup>##△△</sup>	44.03±1.06 <sup>##△△</sup>
芪連結肠宁中剂量组	1.67±0.23 <sup>##</sup>	6.82±0.53 <sup>##</sup>	6.95±0.35 <sup>##</sup>	5.78±0.73 <sup>##</sup>
芪連結肠宁高剂量组	5.03±1.47 <sup>##△△</sup>	15.68±1.53 <sup>##△△</sup>	9.06±0.69 <sup>##</sup>	14.21±4.18 <sup>##</sup>

注:与正常组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$ ;与芪連結肠宁中剂量组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ,<sup>△△</sup> $P<0.01$ 。

比,模型组大鼠 Sobs、Ace、Chao 和 Shannon 指数明显降低( $P<0.01$ ),Simpson 指数明显升高( $P<0.05$ )。与模型组相比,芪連結肠宁中剂量组 Sobs、Ace、Shannon 指数明显升高( $P<0.05$ )。与芪連結肠宁中剂量组相比,芪連結肠宁高剂量组 Sobs、Ace、Chao 和 Shannon 指数明显降低( $P<0.05, P<0.01$ );芪連結肠宁低剂量组与芪連結肠宁中剂量组间 Sobs、Chao、Ace、Shannon 及 Simpson 指数比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。详见表5。

2.6.3 基于 OTU 信息的主坐标(principal components analysis, PCoA)及非度量多维尺度(non-metric multi-dimensional scaling, NMDS)分析 PCoA 得分图中组成差异的解释度值 PC1、PC2 值分别为 27.36%、13.25%,正常组与其他组样本完全分开,表明在经过造模和灌胃干预之后均对大鼠肠道菌群结构产生

一定的影响。在 NMDS 得分图中也可看出芪連結肠宁各剂量组样本都有不同程度向正常组偏移的趋势。详见图3。

2.6.4 基于门水平下各组大鼠肠道微生物优势物种占比情况 门水平下各组大鼠肠道微生物相对丰度占比前5的分别是 Bacteroidota、Firmicutes、Campilobacterota、Spirochaetota、Desulfobacterota,其余菌门占据比例相对较少。与正常组相比,模型组 Bacteroidota、Campilobacterota 均明显增加( $P<0.05, P<0.01$ ),Firmicutes 和 Spirochaetota 均明显减少( $P<0.05, P<0.01$ )。与模型组相比,芪連結肠宁低剂量组和芪連結肠宁中剂量组 Bacteroidota、Campilobacterota 减少( $P<0.05$ ),Firmicutes 及 Spirochaetota 明显增加( $P<0.05$ )。详见表6、图4。

表5 各组大鼠肠道微生物 Sobs、Ace、Chao、Shannon、Simpson 指数比较( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	Sobs	Ace	Chao	Shannon	Simpson
正常组	576.4±39.1	643.35±61.23	659.93±77.87	4.425±0.294	0.036±0.020
模型组	436.2±31.51**	485.99±31.03**	499.74±44.59**	3.696±0.305**	0.099±0.053*
芪連結肠宁低剂量组	491.4±20.12 <sup>#</sup>	540.44±13.84	548.27±14.23	4.065±0.249	0.061±0.030
芪連結肠宁中剂量组	498±57.66 <sup>#</sup>	563.97±65.38 <sup>#</sup>	556.75±73.69	4.167±0.254 <sup>#</sup>	0.044±0.014 <sup>#</sup>
芪連結肠宁高剂量组	401.8±48.40 <sup>△△</sup>	443.64±45.00 <sup>△△</sup>	452.30±47.94 <sup>△△</sup>	3.771±0.509 <sup>△</sup>	0.088±0.052

注:与正常组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$ ;与芪連結肠宁中剂量组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ,<sup>△△</sup> $P<0.01$ 。

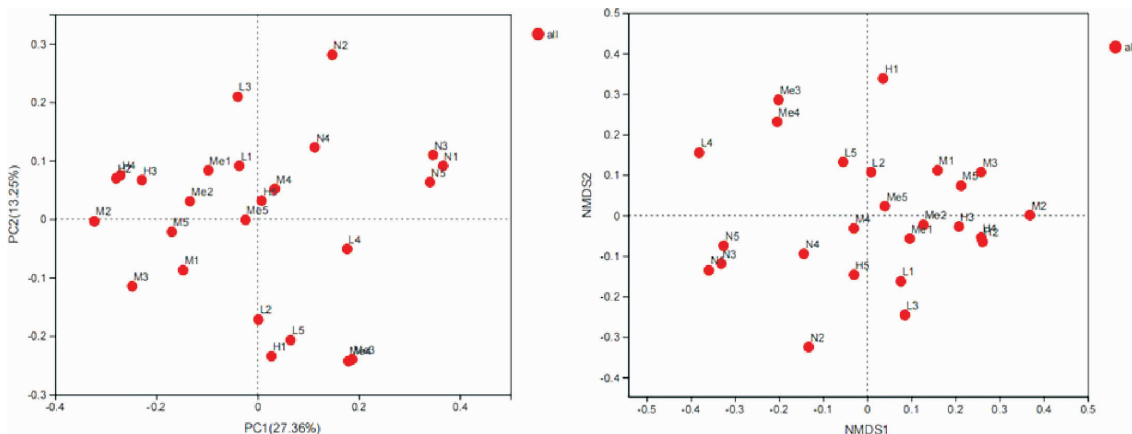


图3 主坐标及非度量多维尺度分析图

注:“N”代表正常组;“M”代表模型组;“L”代表芪連結肠宁低剂量组;“Me”代表芪連結肠宁中剂量组;“H”代表芪連結肠宁高剂量组。

表 6 各组大鼠肠道菌群在门水平前 5 的相对丰度占比情况 ( $\bar{x}\pm s, \%, n=5$ )

组别	Bacteroidota	Firmicutes	Campilobacterota	Spirochaetota	Desulfobacterota
正常组	39.79±10.82	54.27±10.78	1.16±0.40	2.36±1.91	0.93±0.46
模型组	51.57±7.68**	42.74±6.92**	2.80±2.55*	0**	1.35±0.98
芪连结肠宁低剂量组	46.98±9.02#	48.35±7.91#	0.54±0.60#	1.11±1.63#	1.04±0.70
芪连结肠宁中剂量组	44.50±10.51#	51.02±10.33#	1.00±0.10	2.14±2.40	0.90±0.43
芪连结肠宁高剂量组	56.14±8.93	41.74±8.67	0.23±0.24##	0.01±0.03	0.35±0.21

注:表中“0”表示物种丰度极小,可以忽略不计。与正常组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$ 。

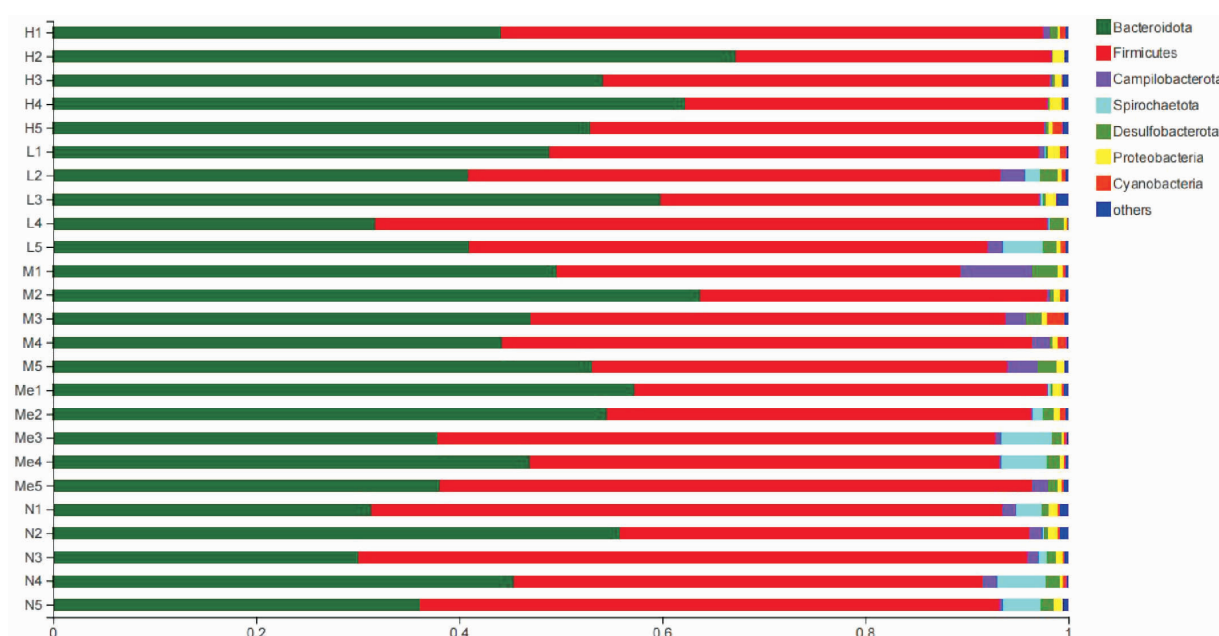


图 4 各组大鼠肠道菌群门水平群落柱形图

注:“N”代表正常组;“M”代表模型组;“L”代表芪连结肠宁低剂量组;“Me”代表芪连结肠宁中剂量组;“H”代表芪连结肠宁高剂量组。

2.6.5 基于属水平下各组大鼠肠道微生物优势物种占比情况 属水平下各组大鼠肠道微生物相对丰度占比前 5 的分别是 *Prevotella*、*norank\_f\_Muribaculaceae*、*Lactobacillus*、*Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*、*unclassified\_f\_Lachnospiraceae*,其余菌属占比相对较少。与正常组相比,模型组 *Prevotella* 明显增加( $P<0.05$ ), *Lactobacillus*、*norank\_f\_Muribaculaceae* 均明显减少( $P<0.01$ )。与模型组比较,芪连结肠宁中剂量组 *Prevotella* 明显减少( $P<0.05$ ),*norank\_f\_Muribaculaceae*、*unclassified\_f\_Lachnospiraceae* 均明显增加( $P<0.01$ )。详见表 7、图 5。

### 3 讨论

UC 属于一种难治性肠道炎症疾病,其发病机制尚不明确,可能与免疫功能、遗传、环境、感染等因素有关<sup>[7]</sup>。目前,西医主要的治疗药物有氨基水杨酸制剂、糖皮质激素、免疫抑制剂等,但都存在不同程度的缺陷,且停药或减少用量都有复发和加重

病情的风险<sup>[8]</sup>。相对而言,中医药治疗 UC 具有独特优势。中医学认为 UC 的发病主要以素体脾胃虚弱为基础,兼之感受外邪或饮食、情志失调等诱因合而为病,导致湿、热、瘀、毒、痰等郁结大肠,气血凝滞,肠络损伤,壅为脓血,遂发此病<sup>[9]</sup>。基于上述理论所创之芪连结肠宁在临床观察中疗效显著<sup>[10]</sup>,在动物实验中也具有明显的健脾止泻和促进溃疡恢复等作用<sup>[11-12]</sup>。方中人参、白术、黄芪、陈皮补气健脾祛湿,黄连、干姜辛开苦降、寒温并用,蒲黄、蒲公英、败酱草、椿皮清热活血、涩肠祛瘀,木香调理肠道气机,白芍酸甘敛阴止痛,甘草调和诸药,全方共奏补脾健胃祛湿、活血拔腐生新、收敛固涩止泻之功效。本实验中 UC 模型大鼠在给予不同剂量芪连结肠宁灌胃之后,其 DAI 评分均降低,结肠组织病理改变均有不同程度改善,表明芪连结肠宁对于 UC 大鼠的结肠损伤具有一定的修复作用。

正常的肠道菌群具有抵抗病原微生物入侵、免疫调节、促营养吸收、调节代谢等作用。在 UC 患者

表7 各组大鼠肠道菌群在属水平前5的相对丰度占比情况( $\bar{x}\pm s$ , %,  $n=5$ )

组别	<i>Prevotella</i>	<i>norank_f_Muribaculaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lachnospiraceae_NK4A136_group</i>	<i>unclassified_f_Lachnospiraceae</i>
正常组	10.77±8.21	23.98±6.29	15.86±3.32	5.57±3.52	3.31±1.27
模型组	30.19±9.17*	13.79±2.85**	5.69±7.82**	5.77±1.99	3.61±1.34
芪连结肠宁低剂量组	20.02±9.76	17.06±3.45 <sup>△</sup>	6.22±2.96	7.96±7.35	5.12±2.42
芪连结肠宁中剂量组	15.41±6.50 <sup>#</sup>	22.83±4.25 <sup>##</sup>	7.34±4.32	6.64±4.09	7.09±3.84 <sup>##</sup>
芪连结肠宁高剂量组	29.43±9.66 <sup>△</sup>	18.39±3.88	5.19±2.24	1.91±2.49	4.48±1.65

注:与正常组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$ ;与芪连结肠宁中剂量组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ,<sup>△△</sup> $P<0.01$ 。

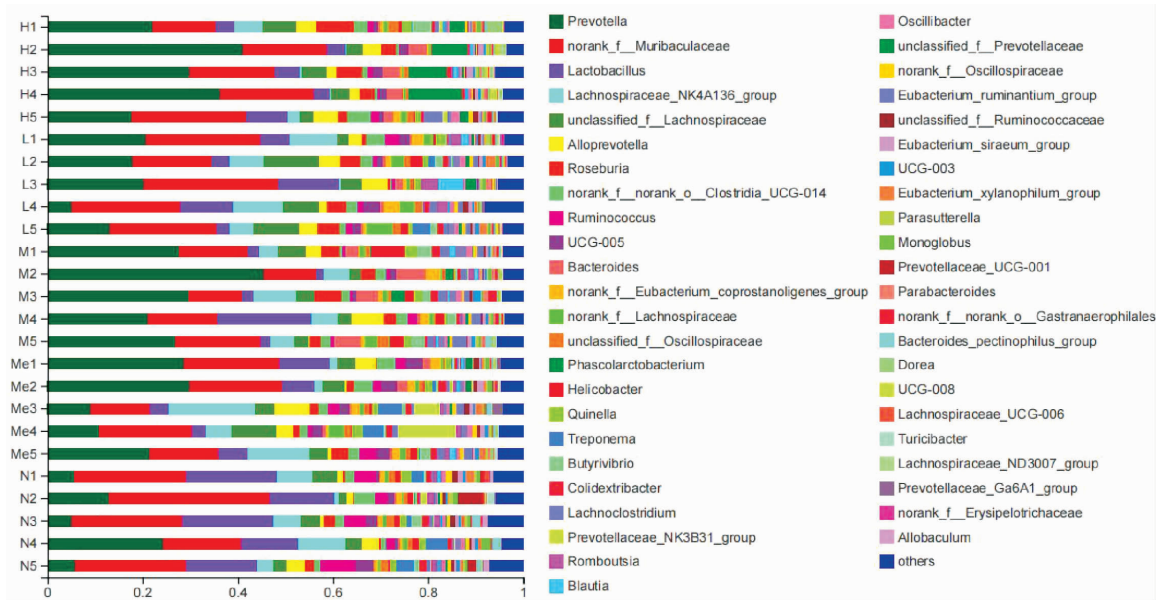


图5 各组大鼠肠道菌群属水平群落柱形图

注:“N”代表正常组;“M”代表模型组;“L”代表芪连结肠宁低剂量组;“Me”代表芪连结肠宁中剂量组;“H”代表芪连结肠宁高剂量组

肠道中菌群的多样性会明显减少,与健康人群相比,*Firmicutes* 比例降低,而变形杆菌和 *Bacteroidota* 比例增加<sup>[13]</sup>。相关动物实验研究表明,DSS 诱导的 UC 模型小鼠 *Bacteroidota* 明显升高、*Firmicutes* 明显减少,经治疗后可明显增加 *Firmicutes* 并抑制 *Bacteroidota*<sup>[14]</sup>。本研究结果也显示,模型组大鼠肠道菌群的丰度及多样性均下降,*Firmicutes*、*Spirochaetota* 比例下调,*Bacteroidota*、*Campilobacterota* 及 *Desulfobacterota* 比例增加;而在经过不同剂量的芪连结肠宁灌胃给药后,其肠道菌群丰度和多样性均有不同程度的恢复,在基于菌群门水平上优势物种的占比与正常组大鼠基本趋于一致,表明芪连结肠宁对 UC 肠道菌群具有明显的调节作用,且芪连结肠宁中剂量组具有明显的优势。肠道菌群紊乱不但表现为有害菌的明显增加,还可表现为有益菌减少,如 *Firmicutes* 中的 *Lactobacillus* 等。研究发现,*Lactobacillus* 可以黏附在肠上皮细胞上,防止病原体入侵,对肠黏膜损伤具有保护作用<sup>[15]</sup>。*Lactobacillus* 也可与免疫细胞直接相互作用,维持胃肠道免疫功能的平衡。本次研

究发现,模型组大鼠 *Prevotella* 丰度明显增加,而 *Lactobacillus* 丰度明显降低,提示 UC 可能与肠道中益生菌和致病菌的动态平衡被打破密切相关。而芪连结肠宁中剂量组大鼠 *Prevotella* 丰度明显降低,提示不同剂量的芪连结肠宁对于肠道菌群的调控效果可能不一致,值得进一步研究。

近年来,肠道菌群的紊乱与 UC 的关系受到越来越多的关注,异常繁殖的肠道致病菌及其衍生代谢物可导致肠道内毒素增多,从而加剧 UC 的病理进展<sup>[16]</sup>。细菌脂多糖是肠道革兰氏阴性菌外膜的主要成分,具有致炎作用<sup>[17]</sup>。当肠道菌群紊乱时,致病菌与益生菌平衡被打破,脂多糖生成增多,参与肠道炎症反应的激活,从而损伤肠黏膜屏障<sup>[18]</sup>;而损伤的肠黏膜屏障失去保护作用,致使肠道中内毒素越过肠上皮细胞进入外周循环,导致全身的慢性炎症状态,进一步加剧 UC<sup>[19]</sup>。TLR4/NF- $\kappa$ B 通路的活化是诱发 UC 发病重要的信号通路之一<sup>[20]</sup>。TLR4 是 Toll 样受体的重要亚型,可特异性识别细菌脂多糖,参与脂多糖信号传导,介导固有免疫炎症反应,从而调节



宿主防御感染、肠内稳态和黏膜先天免疫功能<sup>[21]</sup>。当脂多糖识别 TLR4 后, NF- $\kappa$ B 抑制因子激酶被 NF- $\kappa$ B 诱导激酶磷酸化, 活化的 NF- $\kappa$ B 可与基因中  $\kappa$ B 序列发生特异性结合, 进入核内起始转录, 启动和调节 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等炎症因子表达, 加剧肠道炎症反应<sup>[22]</sup>。本次研究发现, 经过不同剂量的芪连结肠宁灌胃给药后, UC 大鼠结肠组织 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA 表达及血清中 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、IL-6、TNF- $\alpha$  蛋白含量均不同程度降低, 提示芪连结肠宁能有效抑制 UC 大鼠肠道炎症反应。

综上所述, 芪连结肠宁能有效改善 UC 大鼠结肠组织病理性损伤, 抑制肠道炎症状态, 其机制可能与恢复肠道菌群丰度及多样性、调节益生菌与致病菌动态平衡, 进而调控肠道炎症相关蛋白通路有关。当然, 此次研究也存在不足, 如未检测血清中肠道菌群衍生物相关的内毒素含量, 未来还需更加深入的研究。

## 参考文献

- [1] 王一帆, 王凤云, 张佳琪, 等. 中医药调节肠道菌群防治溃疡性结肠炎的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(9): 160-164.
- [2] HU Y, YE Z, WU M Q, et al. The communication between intestinal Microbiota and ulcerative colitis: An exploration of pathogenesis, animal models, and potential therapeutic strategies[J]. *Frontiers in Medicine*, 2021, 8: 766126.
- [3] 燕 彤, 张 军. Toll 样受体与炎症性肠病相关性的研究进展[J]. 胃肠病学, 2019, 24(9): 569-572.
- [4] 王 倩, 包永欣. 2 种质量浓度 DSS 致急性溃疡性结肠炎大鼠模型的构建与比较[J]. 广州中医药大学学报, 2019, 36(4): 574-577.
- [5] 马秀兰, 王秀萍, 王佳林, 等. 大鼠溃疡性结肠炎模型的建立[J]. 中医药临床杂志, 2021, 33(9): 1754-1759.
- [6] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [7] PARK J H, PEYRIN-BIROULET L, EISENHUT M, et al. IBD immunopathogenesis: A comprehensive review of inflammatory molecules[J]. *Autoimmunity Reviews*, 2017, 16(4): 416-426.
- [8] 张玉洁, 梁 洁, 吴开春. 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见溃疡性结肠炎部分解读[J]. 中华消化杂志, 2018, 38(5): 312-314.
- [9] 牛少娟, 张晓艳, 丁晓坤, 等. 溃疡性结肠炎病因病机述评[J]. 河南中医, 2019, 39(5): 799-801.
- [10] 谭华梁, 徐 寅, 肖 麟, 等. 芪连结肠宁方治疗腹泻型肠易激综合征脾虚湿热证临床研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(2): 92-96.
- [11] 蒋士生, 李勇敏, 朱克俭, 等. 芪连结肠宁片对大鼠慢性非特异性溃疡性结肠炎的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 217-219.
- [12] 王红梅, 李勇敏, 朱克俭, 等. 芪连结肠宁片健脾止泻作用研究[J]. 新中医, 2012, 44(3): 124-125.
- [13] 徐 峰, 柯希权. 溃疡性结肠炎与肠道微生物关系研究进展[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2021, 30(9): 969-971.
- [14] 黄钰淇, 姬永宽, 陈国森, 等. 慢溃宁方对溃疡性结肠炎小鼠炎症因子表达及肠道菌群的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(12): 86-95.
- [15] 施丽婕, 刘苏仪, 于 潇, 等. 化瘀通阳方对溃疡性结肠炎模型大鼠肠道菌群和氨基酸代谢的影响[J]. 中医杂志, 2020, 61(19): 1731-1737.
- [16] CANDELLI M, FRANZA L, PIGNATARO G, et al. Interaction between lipopolysaccharide and gut Microbiota in inflammatory bowel diseases[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(12): 6242.
- [17] KRISHNA V, KUMAR N, BANERJEE S. Gut Microbiota and inflammatory disorders[J]. *Current Drug Targets*, 2022, 23(2): 156-169.
- [18] NISHIDA A, INOUE R, INATOMI O, et al. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. *Clinical Journal of Gastroenterology*, 2018, 11(1): 1-10.
- [19] CIESIĘLSKA A, MATYJEK M, KWIATKOWSKA K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2021, 78(4): 1233-1261.
- [20] 郑 洁, 朱 莹, 高 昂. 溃结宁膏穴位敷贴对溃疡性结肠炎脾肾阳虚证大鼠 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2019, 36(10): 1593-1598.
- [21] 赵 柳, 刘 静, 张德凯. 肠道菌群和 TLRs 在结直肠癌中的作用[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2018, 27(12): 1351-1354.
- [22] DE KIVIT S, TOBIN M C, FORSYTH C B, et al. Regulation of intestinal immune responses through TLR activation: Implications for pro- and prebiotics[J]. *Frontiers in Immunology*, 2014, 5: 60.

(本文编辑 黎志清)