

DOI 10.19656/j.cnki.1002-2406.20230801

实验研究

健脾补肾、清肠化湿方对溃疡性结肠炎模型大鼠炎症及肠道菌群的影响

闫叶星, 赵崧, 沈洪[✉]

(南京中医药大学附属医院, 江苏 南京 215000)

【摘要】目的:基于微生物组学方法对溃疡性结肠炎模型大鼠粪便菌群进行研究,探讨健脾补肾、清肠化湿方对溃疡性结肠炎模型大鼠肠道菌群的影响。方法:66只健康SPF级SD大鼠依据随机数字表随机分为空白对照组,模型组,健脾补肾、清肠化湿方组,补肾组,健脾组和清肠组等6组。各给药组依照成人用药浓度灌胃治疗,隔日称量大鼠体质量,10 d后处死大鼠并制作病理切片,计算各组病理评分;酶联免疫吸附法检测血清IL-1 β 、TNF- α 和IL-10水平;基于16S rRNA扩增与高通量测序技术检测大鼠粪便菌群构成及丰度。结果:健脾补肾、清肠化湿方及其拆方明显改善了溃疡性结肠炎组织的病理评分,缓解了结肠黏膜的组织病理学损伤,减少了黏膜杯状细胞的破坏,显著降低了血清IL-1 β 和TNF- α 水平,提高了血清IL-10的水平;通过16S rRNA序列分析验证,发现健脾补肾、清肠化湿方及其拆方有效改善了SD大鼠肠道菌群失调的情况。结论:健脾补肾、清肠化湿方可改善溃疡性结肠炎模型大鼠的肠道炎症反应和组织病理学损伤,并对溃疡性结肠炎模型大鼠的肠道菌群有显著的调节作用。

【关键词】健脾补肾、清肠化湿方;溃疡性结肠炎;肠道菌群

【引用格式】

闫叶星,赵崧,沈洪.健脾补肾、清肠化湿方对溃疡性结肠炎模型大鼠炎症及肠道菌群的影响[J].中医药信息,2023,40(8):1-8.

YAN Y X, ZHAO S, SHEN H. Effect of Jianpi Bushen Qingchang Huashi Formula on inflammation and intestinal flora of SD rats of ulcerative colitis model[J]. Information on TCM, 2023, 40(8):1-8.

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)为消化内科的难治性疾病,随着生活水平的不断提高,UC的发病年龄不断下降,而发病率则呈上升趋势^[1]。中医药治疗UC效果独特,具有简、便、廉、验的特点,一直以来受到学界的广泛关注。

目前UC的中医治疗主要选取白头翁汤、半夏泻心汤、芍药汤、乌梅丸等内服,联用穴位针刺、灸法、穴位敷贴、中药保留灌肠等外治疗法^[2-3]。贺海辉等^[4]认为,根据UC病因病机及传变规律,结合UC患者的临床症状,UC活动期的主要病理因素为湿热蕴肠,其治

法当以清肠化湿为主。荀兰兰^[5]通过对于UC活动期患者的临床对照研究表明,口服根据清肠化湿法所拟定的清肠化湿方并结合协定方灌肠,在腹痛、肛门灼热、里急后重的症状缓解及镜下肠黏膜病变的缓解方面,优于单独服用美沙拉嗪肠溶片。张天涵^[6]研究表明,根据清肠化湿法所制定的清肠化湿方口服联合中药灌肠治疗相较于单独服用美沙拉嗪缓释颗粒,血沉、C反应蛋白及粪便钙卫蛋白等炎症指标均降低。健脾补肾、清肠化湿方是沈洪教授在总结UC治疗临床经验的基础上,以清肠化湿法作为对活动期UC的治疗

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81774243)

第一作者简介:闫叶星(1995-),男,2018级中医内科学专业硕士研究生,主要研究方向:消化系统疾病的中西医结合诊疗及基础研究。

✉通信作者简介:沈洪(1959-),男,教授,主要研究方向:消化系统疾病的中西医结合诊疗及基础研究。

法则,结合临床上UC多累及脾肾等多脏致病的临床特点制定而成。本课题组前期研究发现,健脾补肾、清肠化湿方对大鼠间充质干细胞的体外增殖与迁移有促进作用,从而促进肠干细胞分化,减少肠道炎症反应,进而修复受损肠黏膜^[7]。随着微生物组学在UC临床研究中的广泛应用,发现UC患者肠道微生态失衡的情况较为普遍,为了进一步探索健脾补肾、清肠化湿方的治疗机理,阐释其作用机制,本研究采用微生物组学方法,针对健脾补肾、清肠化湿方及其拆解方进行研究。

1 实验材料和方法

1.1 实验动物

健康成年SD大鼠(上海西普尔-必凯实验动物有限公司)66只,6~7周龄,雌雄不限,体质量179~220 g,SPF级,饲养温度24~25℃,湿度50%~60%,12 h光照/12 h避光,自由采食和饮水。实验前,大鼠至少适应新环境7 d。本实验使用动物经南京中医药大学附属医院伦理委员会审批通过(伦理批号:2020DW-15-03)。

1.2 分组

依据组分中药药理及各自作用,将健脾补肾、清肠化湿方拆分为健脾、补肾、清肠3个部分。将66只大鼠随机分为6组,分别为空白对照组(C),模型组(M),健脾补肾、清肠化湿方组(Z1),补肾组(Z5),健脾组(Z6)和清肠组(Z7),其中空白对照组10只、模型组12只,其余组每组11只。

1.3 药物、试剂及其制备方法

健脾补肾、清肠化湿方组:生黄芪15 g,炒白术10 g,补骨脂15 g,益智仁15 g,黄芩10 g,黄连3 g,地榆10 g,木香6 g,炙甘草3 g;生药浓度2.436 g/mL。

补肾组:补骨脂15 g,益智仁15 g;生药浓度0.840 g/mL。

健脾组:生黄芪15 g,炒白术10 g,炙甘草3 g;生药浓度0.784 g/mL。

清肠组:黄芩10 g,黄连3 g,地榆10 g,木香6 g;生药浓度0.812 g/mL。

以上所有中药饮片均来自江苏省中医院门诊中药房,由江苏省中医院赵崧主任医师鉴定为正品。每组加10倍量纯净水,浸泡药物1 h后煎煮30 min,沥出上清液后,再次加入等量纯净水煎煮30 min,合并两次上清液后浓缩至500 mL^[8]。

造模用葡聚糖硫酸钠(美国MP Biomedicals, CAS: 9011-18-1);IL-1 β 、IL-10及TNF- α 试剂盒(厦门仑昌硕生物科技有限公司,批号分别为YD-30206、YD-30194、YD-31063)。

1.4 造模

空白对照组仅饮用无菌水作为对照,模型组饮用3% DSS无菌水溶液,其余组(Z1、Z5、Z6、Z7)饮用3% DSS无菌水溶液,并分别以健脾补肾、清肠化湿方,补肾药,健脾药,清肠药依照成人用药浓度灌胃治疗,依照体质量每次给药10 mL/kg,造模液自由饮用10 d,每2日换1次水,隔日称量大鼠体质量。

1.5 取材

于解剖前一晚禁食处理,不禁水,麻醉大鼠后处死,心脏取血至少4 mL,十字法剖开大鼠腹腔,剥离结肠,测量其长度,收集粪便,沿结肠纵轴剖开,结肠两端各取0.5 cm,加入1 mL RNA保存液,剩余部分留作组织病理学评估。

1.6 标本处理与分析

1.6.1 病理切片制作

将结肠组织标本采用Swiss-roll的方式翻卷,经10%福尔马林固定、脱水、石蜡包埋后切片^[9],进行苏木精/伊红染色,组织病理学评估结肠炎严重程度,结合HE染色结果,进行溃疡和炎症程度评分^[10-12],标准为溃疡指数评分+炎症程度评分。

溃疡指数评分:正常,无溃疡计0分;轻度,1~2溃疡或累计>20个隐窝计1分;中度,3~4溃疡或累计20~40个隐窝计2分;重度,>4溃疡或超过40个隐窝计3分。

炎症程度评分:正常计0分;轻度黏膜炎症计1分;中度黏膜炎症计2分;重度黏膜炎症计3分。

1.6.2 炎症细胞因子水平

使用ELISA试剂盒进行血清中炎症细胞因子IL-1 β 、IL-10和TNF- α 水平测量,使用自动微板阅读器(Multiskan™ GO; Thermo Fisher Scientific Oy)读取OD值。

1.6.3 DNA抽提和PCR扩增

参考试剂盒说明,对粪便样本微生物群落总DNA进行抽提(E. Z. N. A.® soil DNA kit),通过1%的琼脂糖凝胶电泳检验所提取DNA质量,NanoDrop2000测定DNA浓度和纯度;使用338F(5'-ACTCCTACGGGAGG CAGCAG-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCT AAT-3')对16S rRNA基因V3-V4可变区进行PCR扩增,扩增程序如下:95℃预变性3 min,27个循环(95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸30 s),然后72℃稳定延伸10 min,最后在4℃进行保存(PCR仪:ABI GeneAmp® 9700型)。PCR反应体系为:5×TransStart FastPfu缓冲液4 μ L,2.5 mmol/L dNTPs 2 μ L,上游引物(5 μ mol/L) 0.8 μ L,下游引物(5 μ mol/L) 0.8 μ L,

TransStart FastPfu DNA 聚合酶 0.4 μL , 模板 DNA 10 ng, 补足至 20 μL 。每个样本 3 次重复。

1.6.4 Illumina Miseq 测序

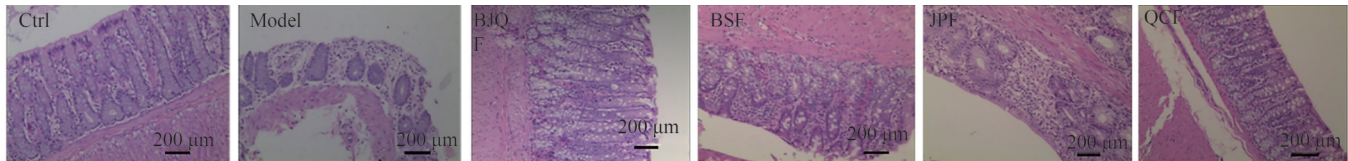
将同一样本的 PCR 产物混合后使用 2% 琼脂糖凝胶回收 PCR 产物, 利用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit 进行回收产物纯化, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并用 Quantus™ Fluorometer (Promega, USA) 对回收产物进行检测定量。使用 NEXTFLEX Rapid DNA – Seq Kit 进行建库, 利用 Illumina 公司的 Miseq 测序仪, 采用 PE300 测序策略进行测序。

1.6.5 数据处理

原始序列采用 fastq^[13] 质控, FLASH^[14] 拼接: ①过滤 reads 尾部质量值 20 以下的碱基, 设置 50 bp 的窗口, 如果窗口内的平均质量值低于 20, 从窗口开始截去后端碱基, 过滤质控后 50 bp 以下的 reads, 去除含 N 碱基的 reads; ②根据 PE reads 之间的 overlap 关系, 将成对 reads 拼接 (merge) 成一条序列, 最小 overlap 长度为 10 bp; ③拼接序列的 overlap 区允许的最大错配比率为 0.2, 筛选不符合序列; ④根据序列首尾两端的 barcode 和引物区分样品, 并调整序列方向, barcode 允许的错配数为 0, 最大引物错配数为 2。使用 UPARSE^[14] 软件, 根据 97%^[15-16] 的相似度对序列进行 OTU 聚类并剔除嵌合体。利用 RDP classifier^[17] 对每条序列进行物种分类注释, 比对 Silva 16S rRNA 数据库 (v138), 设置比对阈值为 70%。

1.7 统计学方法

体质量及病理结果采用 IBM SPSS Statistics 22.0 软件进行方差齐性检验、Mann – Whitney U 检验及 Kruskal – Wallis H 检验, OTUs 聚类分析采用 uparse 聚类法; Alpha 多样性指数采用 Qiime version v. 1.8.0 分析, 并对数据进行抽平处理; Shannon – Wiener 曲线基于 OTU 聚类结果利用 mothur 计算不同随机抽样下的 shannon 值, 利用 R 语言工具制作曲线图; 物种组成分析、PCA 分析采用 R 语言作图; Heatmap 采用 R 语言 vegan 包, vegdist 和 hclust 进行距离计算和聚类分析。距离算法: Bray – Curtis, 聚类方法: complete; 属水平菌群分析采用 Graphpad Prism 6.02 软件进行 Mann – Whitney U 检验及单因素 ANOVA 分析。



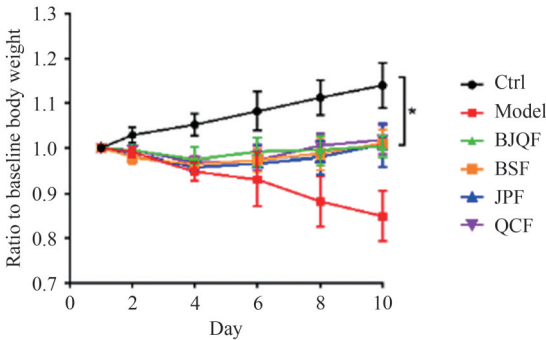
注: Ctrl 为空白对照组; Model 为模型组; BJQF 为健脾补肾、清肠化湿方组; BSF 为补肾组; JPF 为健脾组; QCF 为清肠组。

图 3 各组大鼠结肠组织病理学图 (HE, $\times 100$)

2 结果

2.1 体质量的变化情况

与对照组比较, 模型组体质量持续下降, 而 Z1、Z5、Z6、Z7 均有效改善了体质量的下降情况。各组大鼠体质量及体质量变化率见图 1。

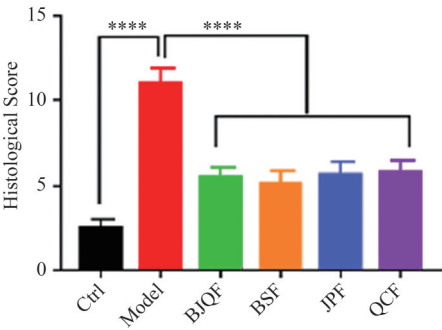


注: Ctrl 为空白对照组; Model 为模型组; BJQF 为健脾补肾、清肠化湿方组; BSF 为补肾组; JPF 为健脾组; QCF 为清肠组。

图 1 各组大鼠体质量变化率比较

2.2 病理情况比较

空白对照组大鼠肠道黏膜结构完整, 界限清晰, 杯状细胞未见破坏, 可见少量散在的炎性细胞。模型组与健脾补肾、清肠化湿方组均存在不同程度炎症和黏膜损伤, 其中模型组杯状细胞减少, 黏膜组织形态紊乱, 隐窝消失, 与模型组比较, 各实验组黏膜组织学结构损伤及杯状细胞破坏程度较轻。结果显示健脾补肾、清肠化湿方对 DSS 引起的 UC 大鼠组织病理学状况有明显的改善作用。组织病理学变化情况和评分比较见图 2 和图 3。



注: Ctrl 为空白对照组; Model 为模型组; BJQF 为健脾补肾、清肠化湿方组; BSF 为补肾组; JPF 为健脾组; QCF 为清肠组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 。

图 2 各组大鼠病理指数评分比较

2.3 血清 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-10 水平变化

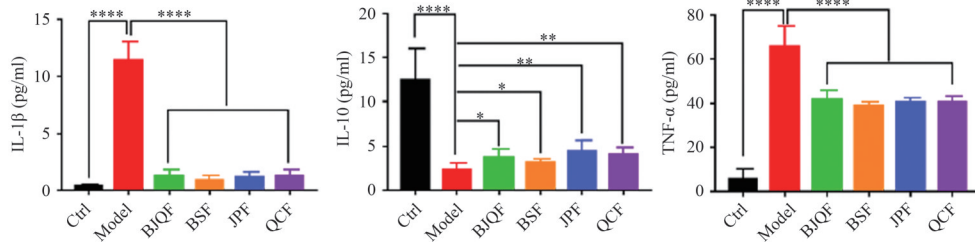
与模型组比较,各实验组 IL-1 β 和 TNF- α 水平均有不同程度的下降,IL-10 的水平虽然未能达到空白对照组水平,但与模型组比较明显更高。见图 4。结合组织病理情况说明健脾补肾、清肠化湿方对 DSS 引起的 UC 大鼠肠道炎症有显著的改善。

2.4 Alpha 多样性分析

采用 Shannon-Wiener 指数反映样本中的微生物

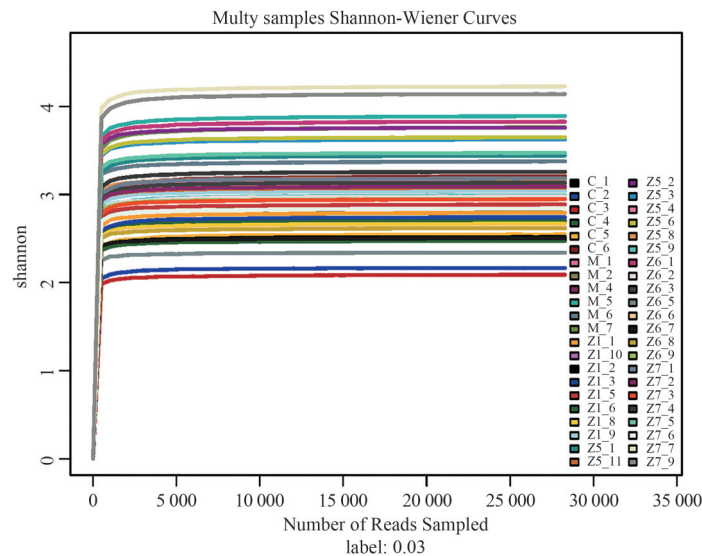
多样性,将测序量与 Shannon-Wiener 指数绘制成图,所得到的即为 Shannon-Wiener 曲线。随着测序量的增加,曲线逐渐平坦,表示测序量已经达到足够大,可以反映样本中绝大多数微生物信息。见图 5。

将 Chao1 指数绘制成箱型图,与空白对照组比较,模型组大鼠粪便菌群的 Chao1 指数提高,给予实验药物后,各实验组大鼠粪便菌群的 Chao1 指数均有降低,但变化差异无统计学意义。见图 6。



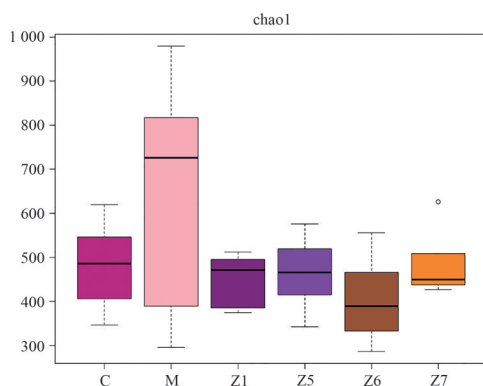
注:Ctrl为空白对照组;Model为模型组;BJQF为健脾补肾、清肠化湿方组;BSF为补肾组;JPF为健脾组;QCF为清肠组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ 。

图4 各组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-10 水平比较



注:C为空白对照组;M为模型组;Z1为健脾补肾、清肠化湿方组;Z5为补肾组;Z6为健脾组;Z7为清肠组。

图5 各组 Shannon-Wiener 指数曲线



注:C为空白对照组;M为模型组;Z1为健脾补肾、清肠化湿方组;Z5为补肾组;Z6为健脾组;Z7为清肠组。

图6 各组 Chao1 指数箱图

2.5 Beta 多样性分析

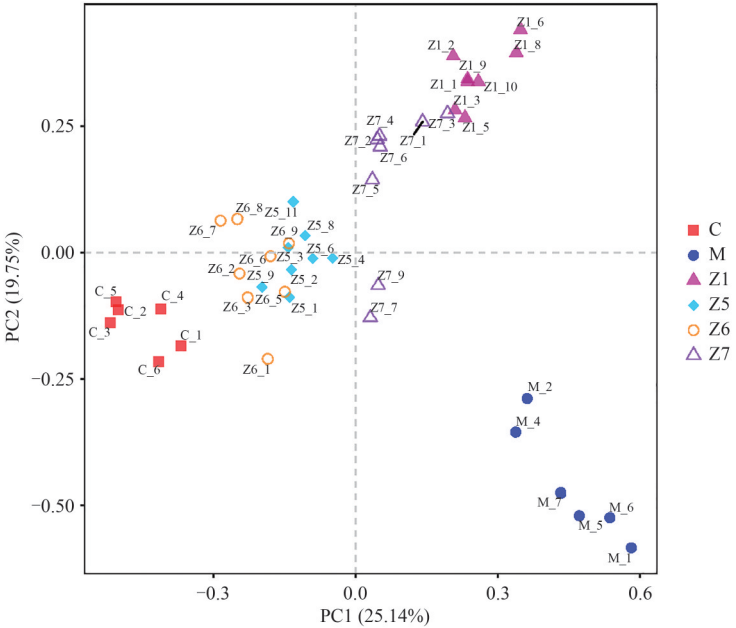
采用主成分分析对不同细菌类群组成进行可视化分析。对样本的微生物群落进行主成分分析发现,空白对照组与模型组菌群结构存在明显差异。给予中药干预后可影响菌群结构,Z5和Z6组肠道菌群结构向空白对照组偏移,同组样本分布区域相近,提示其肠道菌群组成存在差异。见图 7。

2.6 物种组成分析

肠道菌群丰度以总操作分类单元(Operational taxonomic units, OTUs)表示,根据各组或各样本中不同细菌的丰度情况,可绘制出代表各菌种丰度的条形图,

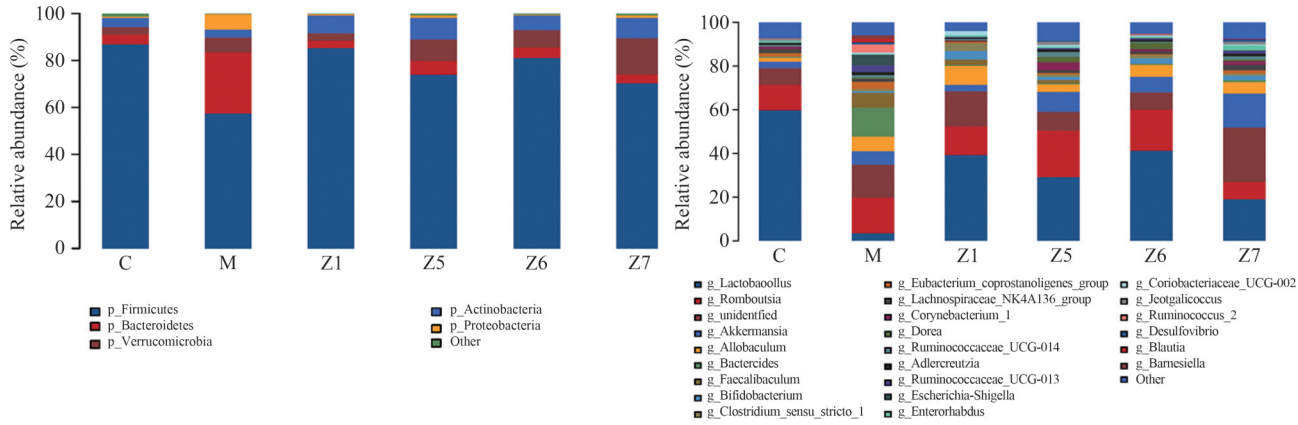
据此可以更直观地分析各菌种的丰度情况。从门水平看,超过 99.9% 的细菌分别属于 8 个门,主要分属于 5 个菌门,分别是厚壁菌门 (Firmicutes)、疣微菌门 (Verrucomicrobia)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、放线菌门 (Actinobacteria) 和变形菌门 (Proteobacteria)。对照组中优势菌群为厚壁菌,其相对丰度占 86.98%,而在模型组中显著减少 ($P < 0.05$),而经实验药物处理后显著增加 ($P < 0.05$),其中在健脾补肾、清肠化湿方组中变化最为显著。在模型组中,拟杆菌、变形菌的丰度明显增加,而各实验组对这种情况产生了明显改善,而乳酸菌作为优势菌,在对照组相对丰度最高,而在模型组中明显下降,在经中药处理后明显上升,健脾补肾、清肠化湿方组及健脾组的相对丰度高于其他中药组。此外,模型组中, *Bacteroides*、*Ruminococcus_2*、*Bifidobacterium* 在模型组中相对丰度明显提高,除了在补肾组中的 *Blautia*

和健脾组中的 *Bifidobacterium* 外,其余的 *Blautia* 和 *Corynebacterium_1* 都在应用中药后得到明显逆转。厚壁菌、拟杆菌是肠道微生物中最为常见的两个门,目前认为,厚壁菌与拟杆菌的丰度比 (F/B Ratio) 与多种疾病相关,可以反映出肠道菌群的稳定状况,比值越高,厚壁菌相对数量越多,代表肠道菌群越稳定,反之,比值越低,代表肠道菌群越为紊乱,由此可以使用厚壁菌与拟杆菌的丰度比来判断各组肠道菌群的紊乱程度^[18]。见表 1。与空白对照组比较,模型组的厚壁菌与拟杆菌丰度明显降低;相较于模型组,各实验组厚壁菌与拟杆菌的丰度比均有不同程度回升,其中以 Z1 组最高,比值是模型组的 12.35 倍, Z5 的回升最低,为模型组的 6.05 倍;这些数据说明健脾补肾、清肠化湿方及其拆方的干预起到了逆转肠道菌群紊乱的作用,并且健脾补肾、清肠化湿方组和健脾组比其他组有更明显的效果。见图 8。



注: C 为空白对照组; M 为模型组; Z1 为健脾补肾、清肠化湿方组; Z5 为补肾组; Z6 为健脾组; Z7 为清肠组。

图 7 基于 OTU 水平的 PCA 图



注: 左为门水平物种组成; 右为属水平物种组成。C 为空白对照组; M 为模型组; Z1 为健脾补肾、清肠化湿方组; Z5 为补肾组; Z6 为健脾组; Z7 为清肠组。

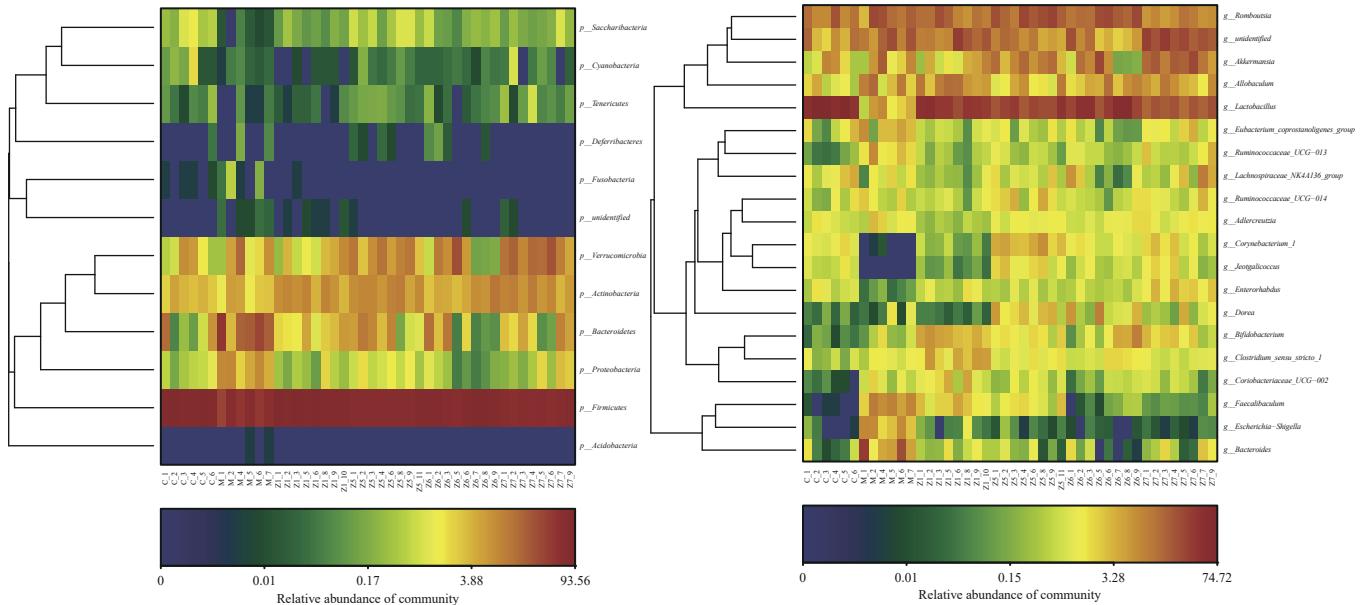
图 8 物种组成分析柱状图

表1 各组厚壁菌门与拟杆菌门丰度比

组别	p_Firmicutes/%	p_Bacteroidetes/%	F/B Ratio
空白对照组	86.89	4.26	20.41
模型组	57.33	26.20	2.19
健脾补肾、 清肠化湿方组	85.24	3.16	27.01
补肾组	74.16	5.60	13.23
健脾组	81.07	4.44	18.26
清肠组	70.36	3.69	19.07

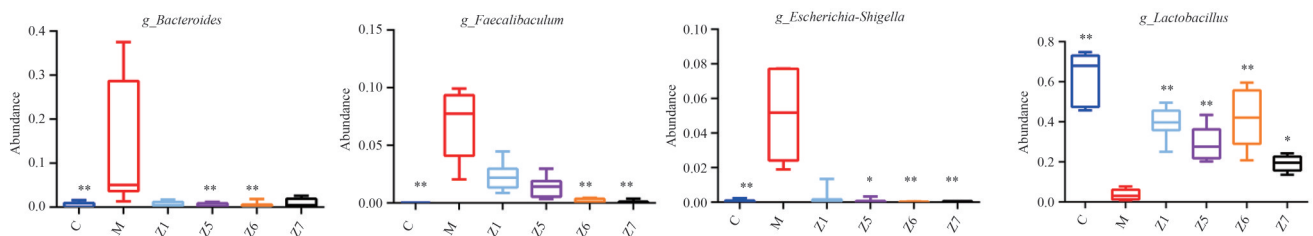
2.7 Heatmap分析

采用Heatmap对样本各菌群进行分析。根据样本中属水平丰度,选取排序前20(TOP20)菌群。在Heatmap中,将在各组中总体丰度更为接近的菌群靠近排列,并用黑色线在左侧链接,用此法可进行聚类分析。见图9。



注:左为门水平丰度;右为TOP20属水平丰度。C为空白对照组;M为模型组;Z1为健脾补肾、清肠化湿方组;Z5为补肾组;Z6为健脾组;Z7为清肠组。

图9 各组大鼠肠道菌群在门水平及TOP20属水平的丰度变化



注:C为空白对照组;M为模型组;Z1为健脾补肾、清肠化湿方组;Z5为补肾组;Z6为健脾组;Z7为清肠组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图10 各差异显著的菌属丰度图

3 讨论

溃疡性结肠炎是一种以慢性肠道炎症引起的肠道免疫紊乱为特征性疾病。健脾补肾、清肠化湿方由生黄芪、炒白术、补骨脂、益智仁、黄芩、黄连、地榆、木香

对TOP20菌属在模型组与空白对照组的丰度进行对比分析,可得出模型组相对于空白对照组丰度有显著差异的菌属,包括 *Escherichia-Shigella*、*Coriobacteriaceae_UCG-002*、*Jeotgalicoccus*、*Enterorhabdus*、*Ruminococcaceae_UCG-013*、*Corynebacterium_1*、*Faecalibaculum*、*Bifidobacterium*、*Bacteroides*、*Lactobacillus*。其中升高的包括 *Escherichia-Shigella*、*Coriobacteriaceae_UCG-002*、*Ruminococcaceae_UCG-013*、*Faecalibaculum*、*Bifidobacterium*、*Bacteroides*;降低的包括 *Jeotgalicoccus*、*Enterorhabdus*、*Lactobacillus*、*Corynebacterium_1*。与模型组比较,在各实验组中,*Bacteroides*、*Escherichia-Shigella*、*Faecalibaculum* 的丰度均有明显降低;*Lactobacillus*在各实验组中均明显升高。见图10。

和炙甘草组成,其组方立意可分为以下三点,一是生黄芪、炒白术、炙甘草健脾力胜,二是补骨脂、益智仁专于补肾,三是黄芩、黄连、木香、地榆更擅清肠化湿。为了探究健脾补肾、清肠化湿方根据中药药理进行归类后

的三种组方各自的作用及三者间的相互作用关系,本研究对健脾补肾、清肠化湿方进行了拆方对照研究。

UC作为难治性消化系统疾病,其对肠道黏膜的影响主要以炎症及溃疡为主,临床上除症状外,组织病理学上的进展也作为UC患者病情与预后的重要评价因素。动物实验显示,DSS诱导溃疡性结肠炎模型大鼠体质量持续下降,健脾补肾、清肠化湿方组相对于模型组大鼠体质量明显增长,表明其逆转了DSS诱导结肠炎模型大鼠的体质量下降趋势。病理结果显示,健脾补肾、清肠化湿方及其拆方组大鼠,其组织学结构损伤较轻,杯状细胞基本完好,这与朱磊等的研究结果一致^[17],此外,健脾补肾、清肠化湿方及其拆方在病理评分、血清炎症因子浓度上均有显著的改善。

本研究中,与空白对照组比较,DSS造模组大鼠粪便菌群的丰富度和多样性均有升高,厚壁菌门与拟杆菌门丰度比显著降低,表示DSS模型组大鼠肠道菌群紊乱,健脾补肾、清肠化湿方的干预降低了大鼠粪便菌群的多样性和丰富度,明显降低了拟杆菌、变形菌的丰度,提高了乳酸菌的丰度,恢复了厚壁菌门与拟杆菌门的丰富度比,表明健脾补肾、清肠化湿方对DSS诱导结肠炎模型大鼠的肠道菌群紊乱有逆转作用。

*Bacteroides*属拟杆菌门(*Bacteroidetes*),与结肠炎炎症标志物呈正相关^[19-21],*Bacteroides*中的*Bacteroides fragilis*可侵入肠道组织造成损伤,*Bacteroides vulgatus*和*Bacteroides ovatus*被发现炎症性肠病的进展相关^[22]。*Escherichia-Shigella*属变形菌门(*Proteobacteria*)肠杆菌目(*Enterobacterales*),是常见的肠道致病菌,与炎症性肠病有关^[17,23],在克罗恩病患者中,肠杆菌科,尤其是大肠埃希菌出现富集现象^[17]。*Faecalibaculum*属厚壁菌门(*Firmicutes*)丹毒丝菌科(*Erysipelotrichaceae*),可产生丁酸以减轻结肠炎症^[24],在空白对照组中,*Faecalibaculum*的丰度较低,其在模型组升高、实验组降低,推测其可能是由于炎症反应或肠道黏膜破坏造成其增殖。*Lactobacillus*属厚壁菌门乳杆菌科,RANGAN等^[25]研究发现,向DSS模型小鼠移植乳杆菌可逆转DSS诱导的结肠缩短,减少炎症,增加结肠干细胞。健脾补肾、清肠化湿方能将DSS造模大鼠的肠道菌群向正常调整,虽然不能达到与正常大鼠完全一致的状态,但仍逆转了多数菌群的失调趋势,从微生物组学角度说明了健脾补肾、清肠化湿方对于DSS诱导结肠炎模型大鼠的肠道菌群有调节作用,改善了其肠道的菌群生态,抑制了*Bacteroides*、*Escherichia-Shigella*两种侵袭性细菌,提高了*Lactobacillus*的丰度。

综上所述,健脾补肾、清肠化湿方表现了对DSS模

型大鼠良好的治疗作用,表现在明显改善了溃疡性结肠炎组织的病理评分,有效改善了结肠黏膜的组织病理学损伤,减少了黏膜杯状细胞的破坏,显著降低了血清IL-1 β 和TNF- α 水平,提高了血清IL-10的水平,并通过16S rRNA序列分析验证,发现其有效改善了各实验组SD大鼠肠道菌群失调的情况。本研究完善了健脾补肾、清肠化湿方的治疗机制研究,从微生物组学的角度探讨了健脾补肾、清肠化湿方的治疗作用机理,为健脾补肾、清肠化湿方的实验与临床研究提供了理论依据。

【参考文献】

- [1] 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): 2769-2778.
- [2] 张声生. 溃疡性结肠炎中医诊疗共识意见[J]. *中华中医药杂志*, 2010, 25(6): 891-895.
- [3] 何碧霞, 朱延涛. 中医药治疗溃疡性结肠炎研究进展[J]. *新中医*, 2020, 52(13): 21-23.
- [4] 贺海辉, 沈洪, 叶柏. 溃疡性结肠炎活动期的病机与治法[J]. *南京中医药大学学报*, 2012, 28(6): 504-505, 512.
- [5] 苟兰兰. 从湿热论治溃疡性结肠炎的理论探讨及临床疗效观察[D]. 南京: 南京中医药大学, 2012: 31.
- [6] 张天涵. 溃疡性结肠炎湿热证与炎症指标(ESR、CRP、FC)相关性分析及清肠化湿方干预的疗效观察[D]. 南京: 南京中医药大学, 2020: 43.
- [7] 朱磊, 沈洪, 顾培青, 等. 健脾补肾、清肠化湿方联合BMSCs对溃疡性结肠炎模型大鼠肠屏障的修复作用[J]. *世界华人消化杂志*, 2016, 24(7): 1017-1023.
- [8] 傅书山, 朱磊, 王琼, 等. 清肠化湿方对溃疡性结肠炎湿热证小鼠NLRP6蛋白及相关炎症因子表达的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2020, 40(5): 582-588.
- [9] 郑祥贞. 分析HE染色技术在病理诊断中的应用[J]. *中国社区医师*, 2016, 32(17): 109, 111.
- [10] BARBIE D A, TAMAYO P, BOEHM J S, et al. Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1[J]. *Nature*, 2009, 462(7269): 108-112.
- [11] MEYLAN E, DOOLEY A L, FELDSEY D M, et al. Requirement for NF κ B signalling in a mouse model of lung adenocarcinoma[J]. *Nature*, 2009, 462(7269): 104-107.
- [12] 王少鑫. CUEDC2在结肠炎相关肿瘤中作用机制的研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2013: 15-16.
- [13] CHEN S, ZHOU Y, CHEN Y, et al. FASTP: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor [J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(17): i884-i890.
- [14] MAGOČ T, SALZBERG S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [15] EDGAR R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 996-998.

- [16] STACKEBRANDT E, GOEBEL B M. Taxonomic Note: a place for DNA – DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 44(4): 846 – 849.
- [17] WANG Q, GARRITY G M, TIEDJE J M, et al. Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(16): 5261 – 5267.
- [18] WRIGHT E K, KAMM M A, TEO S M, et al. Recent advances in characterizing the gastrointestinal microbiome in Crohn's disease: a systematic review[J]. Inflamm Bowel Dis, 2015, 21(6): 1219 – 1228.
- [19] SETOYAMA H, IMAOKA A, HISHIKAWA A et al. Prevention of gut inflammation by Bifidobacterium in dextran sulfate – treated gnotobiotic mice associated with Bacteroides strains isolated from ulcerative colitis patients[J]. Microbes Infect, 2003, 5: 115 – 122.
- [20] BAMBA T, MATSUDA H, ENDO M, et al. The pathogenic role of Bacteroides vulgatus in patients with ulcerative colitis [J]. Gastroenterol, 1995, 30: 45 – 47.
- [21] HUDCOVIC T, KOZAKOVA H, KOLÍNSKA J, et al. Monocolonization with bacteroides ovatus protects immunodeficient SCID mice from mortality in chronic intestinal inflammation caused by long – lasting dextran sodium sulfate treatment [J]. Physiol Res, 2009, 58: 101 – 110.
- [22] KUWAHARA T, YAMASHITA A, HIRAKAWA H, et al. Genomic analysis of Bacteroides fragilis reveals extensive DNA inversions regulating cell surface adaptation [J]. Proc Nat Acad Sci, 2004, 101: 14919 – 14924.
- [23] DARFEUILLE – MICHAUD A, BOUDEAU J, BULOIS P, et al. High prevalence of adherent – invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease [J]. Gastroenterology, 2004, 127: 412 – 421.
- [24] LIU Y, WANG X, CHEN Q, et al. Camellia sinensis and litsea coreana ameliorate intestinal inflammation and modulate gut microbiota in dextran sulfate sodium – induced colitis mice [J]. Mol Nutr Food Res, 2020, 64(6): e1900943.
- [25] RANGAN P, CHOI I, WEI M, et al. Fasting – mimicking diet modulates microbiota and promotes intestinal regeneration to reduce inflammatory bowel disease pathology [J]. Cell Rep, 2019, 26(10): 2704 – 2719.

(收稿日期: 2023 – 03 – 27)

Effect of Jianpi Bushen Qingchang Huashi Formula on Inflammation and Intestinal Flora of SD Rats of Ulcerative Colitis Model

YAN Yexing, ZHAO Song, SHEN Hong[✉]

(Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 215000, China)

【Abstract】 Objective: To study the fecal microbiota of ulcerative colitis model rats based on microbiomics, and explore the effects of Jianpi Bushen Qingchang Huashi (JBQH) Formula on the intestinal microbiota of the same rats. Methods: 66 healthy SPF – grade SD rats were randomly divided into blank control group, model group, JBQH Formula group, kidney – supplementing group, spleen – fortifying group and intestine – clearing group. Each medication group was treated by gavage according to the adult drug concentration, and the body weight of the rats was measured every other day. After 10 days, the rats were euthanized and pathological sections were made, and the pathological scores of each group were calculated. Serum levels of IL – 1 β , TNF – α and IL – 10 were measured by enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA), and the composition and abundance of rat fecal flora were detected by 16S rRNA amplification and high – throughput sequencing technology. Results: JBQH Formula, and its disassembled formulae significantly improved the pathological score of ulcerative colitis, alleviated the histopathology damage of colonic mucosa, reduced the damage of mucosal goblet cell, significantly reduced serum levels of IL – 1 β and TNF – α , and increased serum IL – 10 level. Through 16S rRNA sequence analysis verification, it was found that JBQH Formula, and its disassembled formulae effectively improved the imbalance of gut microbiota in SD rats. Conclusion: JBQH Formula can improve the intestinal inflammatory reaction and histopathological damage in ulcerative colitis model rats, and has a significant regulatory effect on the intestinal flora of ulcerative colitis model rats.

【Key words】 Jianpi Bushen Qingchang Huashi Formula; Ulcerative colitis; Intestinal flora