

• 药理与临床 •

雷公藤对右旋葡聚糖硫酸钠诱导的溃疡性结肠炎小鼠肠道菌群的影响

吴昊, 于小红, 王焕君, 马光朝, 章从恩*, 马致洁*

首都医科大学附属北京友谊医院, 北京 100050

摘要: **目的** 研究雷公藤对右旋葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的溃疡性结肠炎(UC)小鼠的干预作用, 并分析对其肠道菌群的影响, 初步探讨其作用机制。 **方法** 建立 DSS 诱导的 UC 小鼠动物模型, 实验分为对照组、模型组、美沙拉嗪组及雷公藤低、高剂量组。观察给药后小鼠的疾病活动指数(DAI)、结肠长度、结肠厚度、结肠病变大体评分、结肠组织病理学评分, 检测小鼠血清中的肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)水平, 并通过高通量测序法检测小鼠肠道菌群的变化。 **结果** 雷公藤给药后可有效减轻小鼠结肠炎症状, 降低炎症因子表达, 对 UC 小鼠有较好的治疗作用; 菌群测序结果显示模型组小鼠与对照组小鼠相比肠道菌群紊乱, 菌群丰度降低, 经雷公藤治疗之后, 肠道菌群的恢复速度加快, 与模型组相比, 肠道菌群的多样性明显提高, 门水平上主要表现为拟杆菌门比例降低, 硬壁菌门的升高; 属水平上主要表现为毛螺菌和拟杆菌属的减少。 **结论** 雷公藤可以调节 UC 小鼠菌群的组成, 加快菌群的恢复, 对 UC 小鼠有较好的治疗作用。

关键词: 雷公藤; 溃疡性结肠炎; 肠道菌群; 高通量测序; 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-6

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)02-0387-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.02.015

Effect of *Tripterygium wilfordii* on intestinal flora in mice with ulcerative colitis induced by dextran sodium sulfate

WU Hao, YU Xiao-hong, WANG Huan-jun, MA Guang-chao, ZHANG Cong-en, MA Zhi-jie

Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of *Tripterygium wilfordii* on dextran sodium sulfate (DSS)-induced ulcerative colitis (UC) mice, analyze its effects on its intestinal flora, and explore its mechanism. **Methods** Animal models of UC mice induced by DSS were established and divided into control group (Con), model group (Mod), mesalazine group (Mes), low dose group of *T. wilfordii* (RT1) and high dose group of *T. wilfordii* (RT2). The disease activity index (DAI), colon length, colon thickness, colon lesion gross score, colon histopathology score, and TNF- α and IL-6 cytokine expression levels in the serum of the mice were determined. The changes of intestinal flora in mice were detected by high-throughput sequencing, and the mechanism of action of *T. wilfordii* on UC mice was discussed. **Results** After administration of *T. wilfordii*, it effectively alleviated colonic inflammatory symptoms and reduced the expression of inflammatory factors in mice, and had a good therapeutic effect on UC mice. The sequencing results of the flora showed that the mice in the Mod group were more disordered than the Nor group, and the abundance of the bacteria was reduced. After treatment with *T. wilfordii*, the recovery rate of intestinal flora was accelerated. Compared with Mod group, the diversity of intestinal flora was significantly improved. The level of portal was mainly decreased by the proportion of *Bacteroidetes*, and the increase of *Firmicutes*. The genus was mainly characterized by a decrease in the genus *Lachnospiraceae* and *Bacteroides*. **Conclusion** *T. wilfordii* can regulate the composition of UC mouse flora, accelerate the recovery of flora, and have a good therapeutic effect on UC mice.

Key words: *Tripterygium wilfordii* Hook. F.; ulcerative colitis; intestinal flora; high-throughput sequencing; TNF- α ; IL-6

收稿日期: 2019-09-19

基金项目: 首都卫生发展科研专项项目(首发 2016-4-2024); 北京市中医药科技项目(QN2014-18); 首都医科大学附属北京友谊医院“种子计划”项目(YYZZ2018A02)

作者简介: 吴昊(1996—), 男, 在读硕士研究生。E-mail: wuhao906991@163.com

*通信作者 章从恩 Tel/Fax: (010)63138562 E-mail: zce820@163.com

马致洁 Tel/Fax: (010)63138520 E-mail: 13811647091@163.com

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是慢性非特异性炎症性肠病的一种, 其主要的临床表现为腹痛、腹泻、血便等。最初在欧美国家发病较为普遍, 近年来在我国的发病率也逐年提升^[1-2]。UC 的发病原因与发病机制目前均尚不完全明确。随着人们对 UC 认识的不断深入, 许多研究表明, 环境因素、遗传因素、肠道微生物、免疫因素都与 UC 的发生密切相关, 因此本病症并非单一因素造成, 是多种因素共同作用的结果^[3-4]。目前认为机体的免疫系统与肠道微生物的相互作用可能是结肠炎症发生和较难治愈的主要原因之一^[5-6]。一些致病菌如致病性大肠埃希菌、脆弱拟杆菌和螺杆菌等, 在 UC 患者的肠道中检出率明显高于健康人群, 可能与 UC 的发病相关。肠道菌群是包括肠道内细菌和真菌等众多微生物的总称, 而肠道菌群的改变可以改变患者肠道的微生态, 影响患者的免疫和代谢功能, 进而可能对患者产生治疗效果^[7-9]。

雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. F. 为卫矛科雷公藤属一年生藤本植物, 味苦、辛, 性寒, 有大毒, 具有祛风除湿、消肿止痛等功效, 在临床上治疗自身免疫性疑难病症疗效独特^[10-12]。雷公藤与肠道菌群有着密切的联系, 其主要成分雷公藤甲素、雷公藤红素都可以通过调节肠道菌群来发挥作用^[13-14]。近年来研究表明, 雷公藤治疗 UC 有着良好的效果^[15], 但其是否通过调节肠道菌群来发挥治疗作用, 目前尚未见明确报道。基于此, 本研究探讨雷公藤对右旋葡聚糖硫酸钠 (DSS) 诱导的 UC 小鼠的治疗作用及其肠道菌群的调节作用, 为雷公藤治疗 UC 的合理使用提供参考。

1 材料

1.1 试剂与药物

DSS (MP 公司, 批号 31404); 小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 试剂盒 (Biolegend 公司, 批号 B262382); 小鼠白细胞介素-6 (IL-6) ELISA 试剂盒 (Thermo Fisher Scientific 公司, 批号 203539002); 美沙拉嗪肠溶片 (Losan Pharma GmbH 公司, 德国); TransStart Fastpfu DNA Polymerase (AP221-02, 北京全式金生物技术有限公司); DNA 提取试剂盒 (Omega Bio-Tek 公司, 美国); Illumina MiSeq platform (Illumina MiSeq PE300, Illumina 公司, 美国); 雷公藤药材, 采自福建三明, 经首都医科大学附属北京友谊医院中药剂科赵奎君主任药师鉴定为卫矛科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii*

Hook. F. 的干燥根 (主要活性成分雷公藤甲素质量分数为 0.002 2%)。

1.2 仪器

Power Pac3000 型电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); PL-203 电子分析天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]; IX71 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); LGJ-18 型冷冻干燥机 (北京西四环科学仪器厂); Gradient A10 Mill-Q 超纯水器 (美国 Millipore 公司); Forma-86CULT Freezer 超低温冰箱 (Thermo Electron 公司); KQ5200E 超声提取清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); mindray BS-300 自动生化仪 (上海富众生物科学有限公司); Leica 2016 石蜡切片机 (上海莱卡仪器有限公司); 酶标仪 (Thermo Fisher Scientific 公司); ABI GeneAmp[®] 9700 型 PCR 仪 (ABI 公司, 美国); NanoDrop2000 超微量分光光度计 (Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.3 实验动物

SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠, 50 只, 8~10 周龄, 体质量 20~22 g, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 许可证号为 SCXK (京)-2016-0002, 饲养于首都医科大学附属北京友谊医院实验动物中心, 室内保持 12 h 明暗交替。动物饲养使用的标准鼠饲料和水以及所有动物实验均按照首都医科大学附属北京友谊医院动物伦理委员会相关规定进行。

2 方法

2.1 实验药物制备

精确称取适量雷公藤生品, 打粉机打碎成颗粒状, 用 8 倍量水充分润湿, 放置浸泡 1 h, 加热煮沸后回流提取 45 min, 趁热 3 层纱布滤过, 滤渣再加 6 倍量水回流提取 30 min, 滤过, 合并滤液, 滤液浓缩至一定体积后冷冻干燥成粉末, 制得雷公藤供试样品 (含雷公藤甲素 0.002 2%)。

2.2 动物分组及给药方案

50 只 C57BL/6 小鼠正常饲养 1 周后, 随机分为 5 组, 每组 10 只, 分别为对照组、模型组、美沙拉嗪组 (50 mg/kg) 及雷公藤低、高剂量组 (2、4 g/kg)。实验时间共为 10 d, 对照组、模型组 ig 给予生理盐水, 美沙拉嗪组及雷公藤低、高剂量组按上述剂量 ig 给药。给药 3 d 后, 将除对照组以外的所有组别的小鼠饮水皆换为 2.5% DSS 溶液。记录实验小鼠每天体质量、摄食量及饮水量。

2.3 检测指标与方法

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

评分 在整个实验期间, 每日观察、记录各组小鼠的一般情况, 包括精神状态、活动、小鼠的粪便性状及便血情况, 分析治疗前后结肠病变的变化。按照 DAI 评分标准 (表 1) 进行评分^[6]。评分依据为黏着于肛门的水样便为稀便, 不黏着于肛门的糊状大便为半稀便, 成型大便为正常便。计算方法为 $DAI = (\text{体质量下降分值} + \text{粪便性状分值} + \text{便血情况分值})/3$ 。

2.3.2 结肠长度、厚度及结肠大体评分 于实验第 10 天, 采用颈椎脱臼法处死各组小鼠, 分离整段结肠组织, 用标尺测量各组小鼠结肠长度及厚度, 进行统计学分析。测量后, 纵行剖开整段结肠, 预冷生理盐水冲洗清洁数次, 并用滤纸吸干, 大头针固定平铺, 肉眼观察结肠黏膜炎症及溃疡情况, 参照 Ekstrom 等^[17]的标准进行评分, 评分标准见表 2。

表 1 DAI 评分标准
Table 1 DAI scoring criteria

记分	体质量下降/%	粪便状态	便血情况
0	0	正常	阴性 (-)
1	0~5	介于两者之间	介于两者之间
2	5~10	半稀便	隐血 (+)
3	10~15	介于两者之间	介于两者之间
4	≥15	稀便	肉眼血便

表 2 结肠病变评分标准
Table 2 Colonic lesion scoring criteria

评分	结肠病变
0	黏膜无损伤
1	黏膜充血
2	溃疡面积小于受损面积的 25%
3	溃疡面积为受损面积的 25%~50%
4	溃疡面积大于受损面积的 50%

2.3.3 结肠病理组织学观察及评分 取各组小鼠病变结肠组织常规石蜡包埋, 切片, HE 染色。参照 Boirivant 等^[18]的标准行盲法评分, 根据上皮细胞形态、炎症细胞浸润情况等, 由 2 位病理科医师分别双盲阅片, 结果取均值进行评分。以小鼠结肠病理组织学评分作为判断炎症程度的主要标准。参照评分标准见表 3。

2.3.4 动物取血及血清处理 实验第 10 天, 对每组小鼠眼眶取血留取血液, 采用 3 000 r/min, 4 ℃离心 10 min, 留取血清。ELISA 试剂盒测定 TNF- α 、IL-6 含量, 具体步骤按试剂盒说明书进行操作。

表 3 结肠病理组织学评分标准
Table 3 Colon histopathology scoring criteria

评分	结肠病理组织学改变
0	正常
1	极低白细胞浸润, <10%高倍视野
2	少量白细胞浸润, 10%~25%高倍视野
3	中量白细胞浸润, 25%~50%高倍视野, 血管密集, 肠壁增厚
4	大量白细胞浸润, >50%高倍视野, 血管明显密集, 肠壁破坏

2.4 粪便样品采集及处理

于实验第 10 天处死小鼠, 剖开腹腔, 取出肛门至盲肠末端的完整结肠组织并置于冰盘上, 沿肠系膜纵向剖开结肠组织, 取出结肠内粪便颗粒 (2~3 粒) 收集于冻存管中, 立即放于液氮内保存, 待提取粪便中细菌的 DNA。

2.5 粪便中细菌 DNA 的提取及测序

2.5.1 DNA 的提取与检测 使用 DNA 提取试剂盒提取粪便中的总 DNA, DNA 浓度和纯度利用 NanoDrop2000 进行检测, 利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量。

2.5.2 PCR 扩增与产物回收 以细菌 16 S rRNA 基因的 V3~V4 可变区序列为靶标, 以带有 barcode 序列的 338F-806R 为引物, 进行 PCR 扩增, 获取 PCR 产物, 使用 2%琼脂糖凝胶回收 PCR 产物, 利用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences, 美国) 进行纯化, Tris-HCl 洗脱, 2%琼脂糖电泳检测。

2.5.3 荧光定量 参照电泳初步定量结果, 利用 QuantiFluorTM-ST (Promega, USA) 进行检测定量。之后按照每个样本的测序量要求, 进行相应比例的混合。

2.5.4 Illumina MiSeq PE300 测序 PCR 产物经过定量及文库构建后, 利用 Illumina MiSeq PE300 平台进行高通量测序, 获取细菌 16 S rRNA 基因的 V3~V4 可变区碱基序列信息, 利用 QIIME2.0 软件包, 对测序片段进行 OTU (分类学操作单元) 聚类, OTU 代表序列与 silva 数据库进行比对分析, 获取 OTU 对应的分类单元 (包括门纲目科属种) 及其相应的丰度信息, 计算 Chao1 和 Shannon 等度量指数, 评估样品中细菌菌群的丰富度和均匀度, 应用 PICRUST 软件, 预测各组样品菌群的代谢功

能, 从中找出有差异的组分, 为后续深入挖掘菌群的功能、剖析作用机制提供参考。

2.6 数据统计学处理

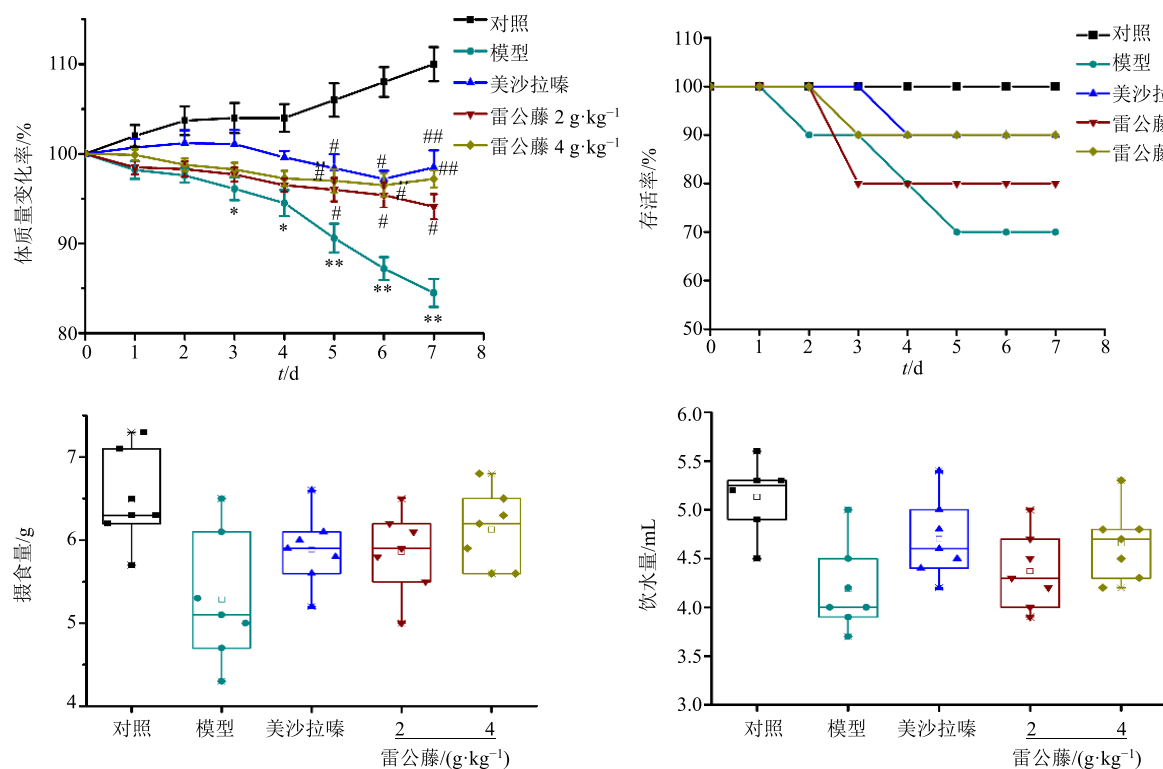
数据分析采用 SPSS 22.0 统计学软件包, 正态分布连续性资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多样本均数比较且方差齐者使用方差分析。

3 结果

3.1 一般体征结果

对各组小鼠造模开始后每天的体质量、摄食量及饮水量进行记录分析, 对照组小鼠摄食及饮水正常, 且体质量呈现上升趋势; 模型组小鼠自造模开

始后, 饮食减少, 活动能力下降, 毛色无光泽, 体质量有一定的下降, 且从造模第 3 天起, 体质量下降较对照组有统计学意义 ($P < 0.05$); 雷公藤低剂量组小鼠体质量也有所下降, 但自第 5 天起, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$); 雷公藤高剂量组小鼠在造模后期体质量有所回升, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$)。除对照组小鼠以外, 造模后各组小鼠均有死亡现象发生 (模型组死亡 3 只, 雷公藤低剂量组死亡 2 只, 雷公藤高剂量组和美沙拉秦组各死亡 1 只), 且摄食量及饮水量均存在一定变化 (图 1)。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 下同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below

图 1 雷公藤对 DSS 诱导的 UC 小鼠体质量、生存率、摄食量、饮水量的影响

Fig. 1 Effect of *T. wilfordii* on body weight, survival rate, food intake, and water intake of DSS-induced UC mice

3.2 DAI 评分结果

各实验组小鼠从造模开始后每天固定时间评估各组小鼠 DAI 评分, 采用重复测量设计的方差分析。模型组小鼠造模后第 2 天出现排便次数增加, 出现软便、水样便等情况; 第 4 天出现大便隐血、血便情况。美沙拉秦组及雷公藤低、高剂量组小鼠在给予药物治疗后, 活动增加, 毛发情况改善, 且大便性状也有所改善, DAI 评分较模型组显著降低 ($P <$

0.05)。结果显示, 雷公藤高、低剂量对 UC 小鼠有一定的治疗作用, 能改善小鼠的一般情况 (图 2)。

3.3 结肠一般情况与病理组织学观察结果

3.3.1 结肠长度与厚度 分离出整段结肠组织, 用标尺测量各组小鼠结肠长度及厚度, 并进行相关统计学分析。结果显示, 对照组小鼠结肠长度最长, 模型组小鼠结肠长度最短, 且模型组与对照组比较, 差异显著 ($P < 0.01$); 美沙拉秦组及雷公藤低、高

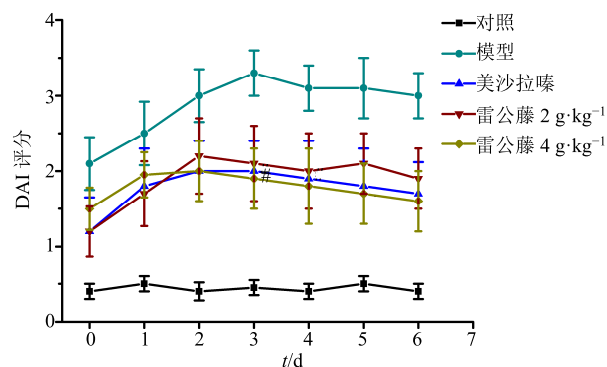


图 2 雷公藤对 DSS 诱导的 UC 小鼠 DAI 评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effect of *T. wilfordii* on disease activity index of DSS-induced UC mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

剂量组小鼠结肠长度要显著长于模型组 ($P < 0.05$)。在进行结肠厚度比较时,模型组小鼠结肠厚度最大,这可能是由于模型组小鼠结肠损伤较为严重,模型组与对照组比较,差异显著 ($P < 0.01$),美沙拉嗪组及雷公藤低剂量组小鼠结肠厚度较模型组显著降低 ($P < 0.05$);雷公藤高剂量组较模型组小鼠结肠厚度降低得更显著 ($P < 0.01$),结果见图 3。

3.3.2 结肠大体形态学评分 按照表 2 所述标准,对各组小鼠结肠进行大体形态学评分,对照组小鼠

大部分结肠无充血、无水肿、无溃疡,少部分结肠黏膜有轻微充血;模型组小鼠结肠黏膜弥漫性充血、有水肿、有溃疡,部分溃疡表面有坏死组织;美沙拉嗪组及雷公藤低、高剂量组小鼠近肛侧结肠黏膜中度充血,有水肿,溃疡程度较模型组明显减少,且结肠病变不明显。评分结果显示,模型组与对照组比较,差异显著 ($P < 0.01$),美沙拉嗪组及雷公藤低、高剂量组小鼠结肠大体形态学评分与模型组比较,差异显著 ($P < 0.01$),结果见图 3。

3.3.3 HE 染色及病理组织学评分 对结肠病变组织进行 HE 染色,并进行病理组织学评分。结果显示对照组小鼠黏膜层肠腺排列紧密,肠腺上皮细胞形态正常,结构正常无溃疡;模型组小鼠结肠可见明显溃疡,黏膜层肠腺及上皮完全丧失,并伴有大量炎性细胞浸润,炎症侵及黏膜下层及肌层;美沙拉嗪组及雷公藤低、高剂量组给药后,炎性细胞浸润减少,肠黏膜上皮细胞完整性改善,结肠黏膜损伤改善。病理组织学评分结果显示,与对照组比较,模型组病变评分显著增高 ($P < 0.01$)。与模型组相比,雷公藤高、低剂量组病理评分显著降低 ($P < 0.01$)。结果见图 3 和 4,表明雷公藤能改善 DSS 诱

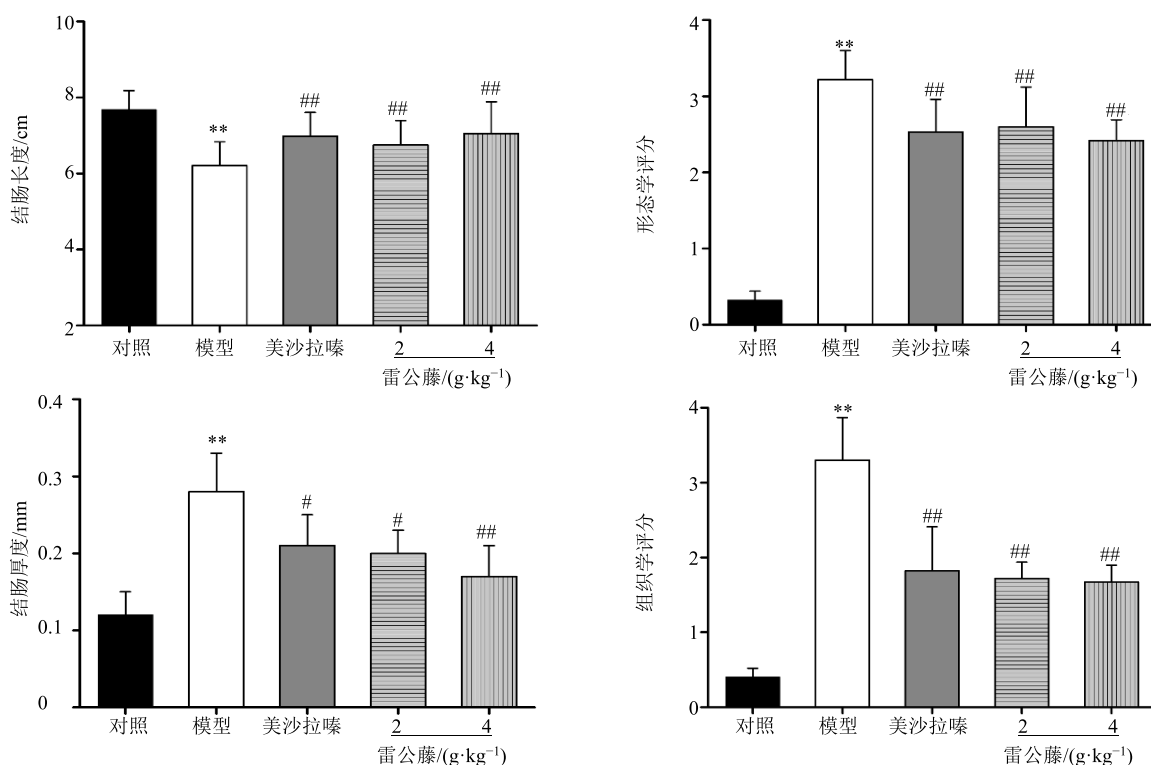


图 3 雷公藤对 DSS 诱导的 UC 小鼠结肠损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effect of *T. wilfordii* on colonic injury in DSS-induced UC mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

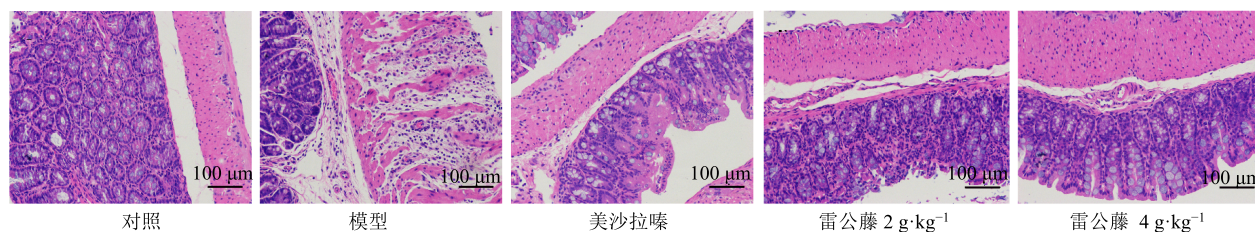


图 4 各组小鼠结肠 HE 染色结果

Fig. 4 Representative hematoxylin-eosin (HE) staining of colon tissues of mice in each group

导的 UC 模型小鼠结肠炎症, 具有减轻 UC 小鼠结肠局部病变损害的作用。

3.4 血清炎症因子检测结果

检测各组小鼠血清中 IL-6、TNF- α 的水平。结果显示, 对照组小鼠血清中 IL-6、TNF- α 水平最低; 模型组血清中 IL-6、TNF- α 水平最高, 且较对照组显著升高 ($P < 0.01$); 美沙拉嗪组及雷公藤低、高剂量组小鼠血清中 IL-6 水平与模型组比较显著降低 ($P < 0.05$), TNF- α 水平与模型组比较也显著降低 ($P < 0.01$)。结果见图 5, 表明雷公藤可以抑制 UC 小鼠局部结肠组织 IL-6、TNF- α 的表达。

3.5 各组小鼠结肠菌群多样性分析

通过单样品的多样性分析 (α 多样性) 可以反映微生物群落的丰度和多样性, 包括统计学分析指数估计环境群落的物种丰度和多样性。计算菌群丰度的指数有 Chao 指数, 是用 Chao1 算法估计样品中所含 OTU 数目的指数, Chao1 在生态学中常用来估计物种总数; Shannon 指数, 计算菌群多样性的指数, 用来估算样品中微生物多样性指数之一, 与 Simpson 多样性指数常用于反映 α 多样性指数。Shannon 值越大, 说明群落多样性越高; Faith-pd 数表明微生物种群丰度, 且包括稀有物种丰度。实

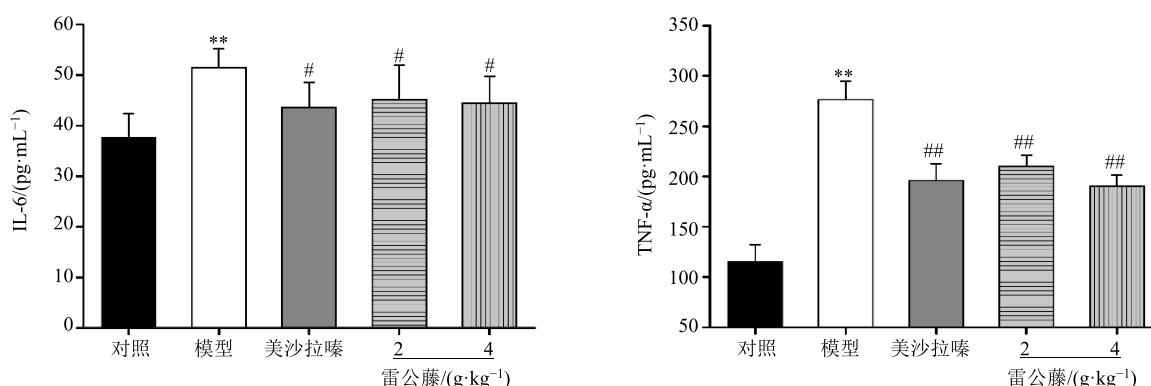
验结果表明, 经过 2.5% DSS 诱导后, 各组小鼠肠道菌群的物种总数降低, 其中模型组小鼠物种总数最低, 经雷公藤治疗后, 肠道的物种总数明显恢复; 造模后, 各组小鼠肠道菌群的多样性明显降低, 经过雷公藤治疗后, 肠道菌群的多样性明显提高; 且在造模后微生物种群丰度趋向于平均化, 且在雷公藤治疗后, 稀有物种丰度有所增加。结果见图 6。

3.6 肠道菌群物种注释及差异分析

基于 OTU 的绝对丰度及注释信息, 对每个样品在门水平和属水平上的序列数目占总序列数的比例进行统计分析, 确定了各组在门和属水平上的物种组成差异 (图 7)。

3.6.1 对照组菌群构成 菌群谱反映正常小鼠肠道菌群构成。硬壁菌门 (66.92%)、拟杆菌门 (25.30%)、变形菌门 (4.2%)、放线菌门 (1.55%) 是 4 大主要细菌门类。S24-7 菌、葡萄球菌、毛螺菌、梭菌目、颤螺菌属、嗜冷杆菌属、理研菌科、拟杆菌属为对照组小鼠肠道菌群在属水平上的主要构成, 其主要菌属的改变对肠道细菌屏障的建立起到关键作用。

3.6.2 模型组菌群构成 菌群谱反映 2.5% DSS 对小鼠肠道菌群的破坏。经过 2.5% DSS 诱导后, 4 大主要菌门的构成比发生显著改变: 硬壁菌门 (55.20%)

图 5 雷公藤对 DSS 诱导的 UC 小鼠血清中 IL-6、TNF- α 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 5 Effect of *T. wilfordii* on IL-6 and TNF- α in serum of DSS-induced UC mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

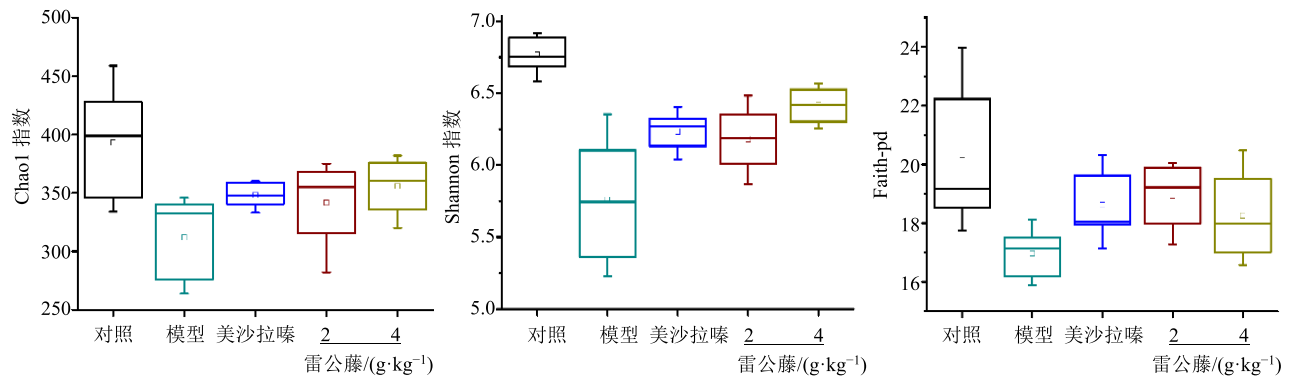


图 6 雷公藤对 DSS 诱导的 UC 小鼠肠道菌群多样性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Effect of *T. wilfordii* on intestinal microflora diversity in DSS-induced UC mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

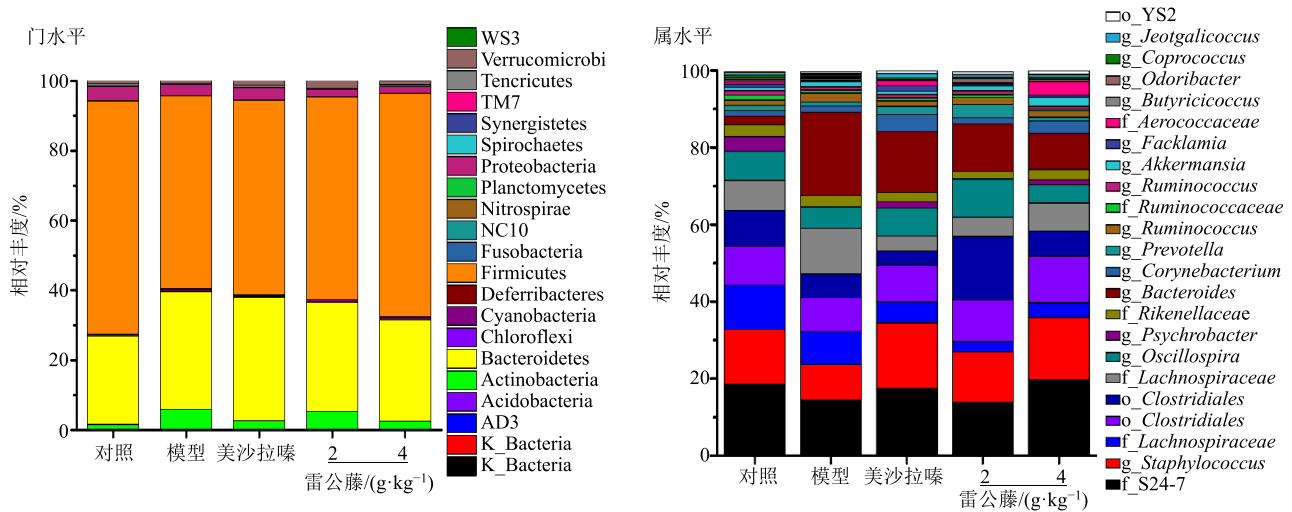


图 7 雷公藤对 DSS 诱导的 UC 小鼠肠道菌群的影响

Fig. 7 Effect of *T. wilfordii* on intestinal microflora in DSS-induced UC mice

与对照组比较明显减少, 拟杆菌门 (33.68%) 明显增加, 变形菌门 (3.24%) 差异不大, 放线菌门 (5.89%) 增加。S24-7 菌、葡萄球菌显著减少, 毛螺菌、拟杆菌属显著增加。

3.6.3 美沙拉嗪组菌群构成 造模小鼠经美沙拉嗪治疗 7 d 后取结肠内肠道内容物, 其菌群反映美沙拉嗪对造模小鼠肠道菌群的影响。硬壁菌门 (55.87%)、拟杆菌门 (35.89%)、变形菌门 (3.62%)、放线菌门 (2.62%) 4 大主要细菌门类与模型组相比差异不大。在属水平上与模型组相比, 葡萄球菌、颤螺菌属、嗜冷杆菌属增加, 而拟杆菌属减少。

3.6.4 雷公藤低剂量组菌群构成 造模小鼠经雷公藤低剂量治疗 7 d 后取结肠内肠道内容物, 其菌群反映雷公藤低剂量对造模小鼠肠道菌群的影响。硬壁菌门 (58.08%) 与模型组比较增加, 拟杆菌门

(38.24%) 增加, 变形菌门 (2.23%) 减少, 放线菌门 (5.20%) 增加。葡萄球菌、梭菌目、颤螺菌属显著增加, 毛螺菌、拟杆菌属显著减少。

3.6.5 雷公藤高剂量组菌群构成 造模小鼠经雷公藤高剂量治疗 7 d 后取结肠内肠道内容物, 其菌群反映雷公藤高剂量对造模小鼠肠道菌群的影响。硬壁菌门 (64.02%) 与模型组比较显著增加, 拟杆菌门 (28.98%) 明显减少, 变形菌门 (1.95%), 放线菌门 (2.46%) 差异不大。在属水平上与模型组比较, 结果显示, S24-7 菌、葡萄球菌、梭菌目显著增加, 毛螺菌、拟杆菌属显著减少。

3.7 LefSe 分析

进一步采用 LefSe 分析比较 2.5% DSS 诱导处理所引起的肠道菌群丰度在各物种分类水平上的差异。LefSe 方法是非参数检验和线性判别分析的结果。

合, 适合菌群丰度差异检验, 以 LDA 值大于 3.5 为筛选标准, 确定在这个组中丰度较高的微生物。LefSe 分析 LDA 柱形图 (图 8) 更直观地看出, 在科水平及属水平上, 对照组显著性最高的交替单胞菌目 (Alteromonadales)、消化球菌科 (Peptococcaceae)、嗜冷杆菌属 *Psychrobacter*、瘤

胃球菌属 *Ruminococcus*; 模型组显著性最高的为拟杆菌科 (Bacteroidaceae)、拟杆菌属 *Bacteroides*; 雷公藤组显著性最高的为气球菌科 (Aerococcaceae)、皮杆菌科 (Dermabacteraceae)、鞘脂杆菌科 (Sphingobacteriaceae)、杆菌属 *Bacillus*。

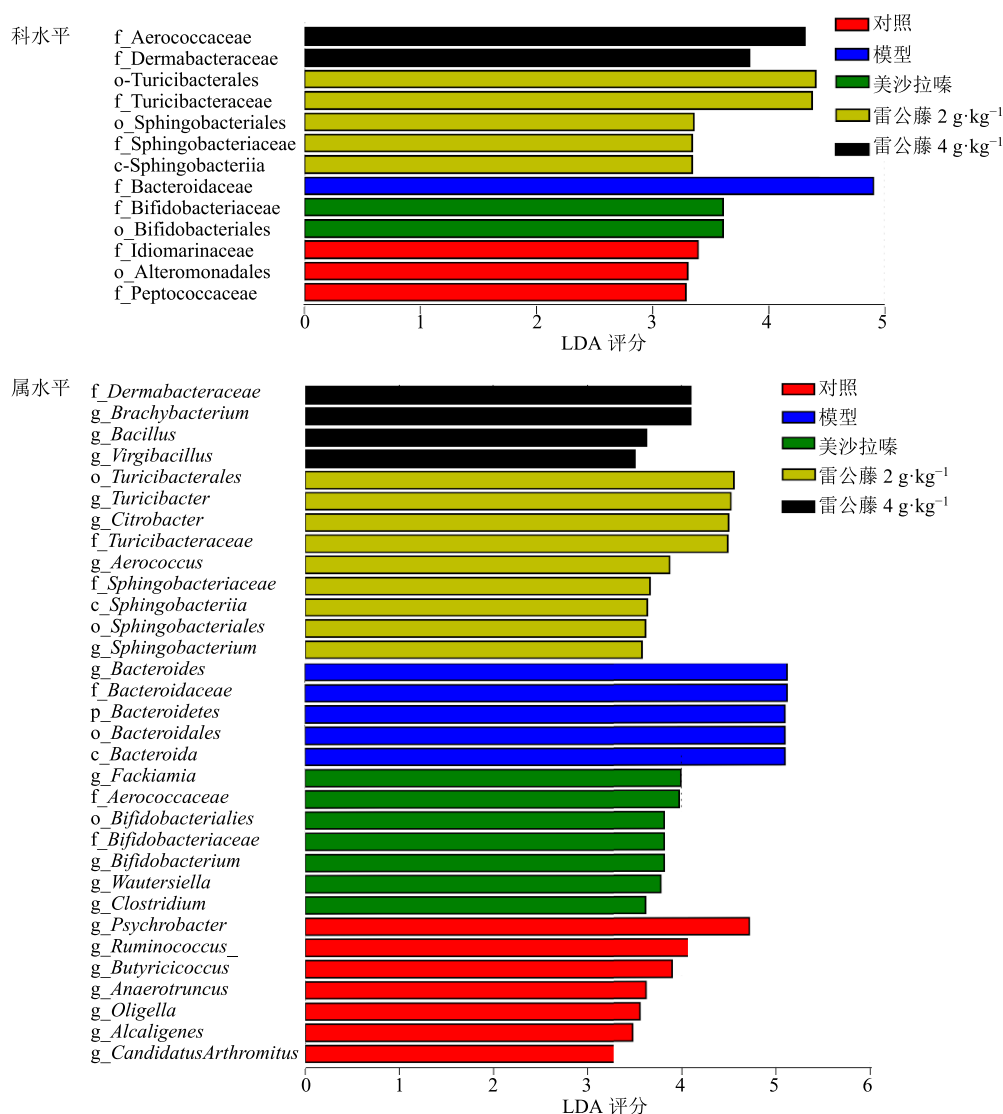


图 8 线性判别分析效应大小识别细菌的不同丰度

Fig. 8 Linear discriminant analysis effect size identifies differential abundance of bacteria

这些结果表明, 雷公藤治疗后拟杆菌门比例降低, 硬壁菌门比例升高, 毛螺菌和拟杆菌属显著减少, 菌群的改变可能在 UC 发病中发挥作用。结果证实, 雷公藤的治疗可以调节 UC 小鼠菌群的组成, 加快菌群的恢复, 改善肠道菌群结构。

4 讨论

雷公藤最早收载于《神农本草经》, 因其性味苦

寒有大毒, 在传统方法中外用较多, 不予内服, 临床应用过程中发现雷公藤在一定剂量范围内具有治疗自身免疫性等难治性疾病的作用, 也是迄今证明疗效最为确切的一味中药, 几乎没有类似的中药可以代替。近年来研究表明, 雷公藤对治疗 UC 有着良好的效果。本研究通过 DSS 诱导的 UC 小鼠模型, 对小鼠一般体征、DAI 评分、结肠长度、结肠厚度、

结肠病变大体评分、结肠组织病理学评分以及小鼠血清中的 TNF- α 和 IL-6 细胞因子水平进行检测,结果表明雷公藤对于 UC 小鼠有一定的治疗作用。同时,雷公藤的作用与肠道菌群也有密切关系,其主要成分可以通过调节肠道菌群来发挥作用^[13-14],但其是否通过调节肠道菌群来发挥对 UC 小鼠治疗作用,目前尚不清楚,本研究进一步探讨雷公藤对 UC 小鼠肠道菌群的影响。

肠道正常菌群可以构成机体的肠黏膜屏障,对肠道起到保护作用。肠道菌群的改变可以影响肠道的微生态,进而影响机体的免疫和代谢功能,导致多种自身免疫性疾病和肠道疾病的发生。近年来 UC 在我国的发病率逐年提升,但其发病原因与发病机制尚不完全明确,目前大量研究认为肠道菌群与 UC 发病有着密切关系。Nishikawa 等^[19]使用 PCR-RFLP 技术对比了 UC 患者与正常人群肠道内的菌群数量,结果发现 UC 患者粪便中所得到的限制性片段数量明显少于健康对照组;Macfarlane 等^[20]对 UC 患者与正常人群肠道内菌群种类的数量及构成进行了分析,结果证实正常人群肠道内厌氧菌与兼性厌氧菌的比例为 20:1,而 UC 患者肠道内这一比例为 2.5:1,与正常人群存在很大差异。刘志威等^[21]收集了 UC 患者 46 例,检测其大肠杆菌、双歧杆菌和乳酸杆菌含量及 Th17、Treg 细胞与健康对照组相比较,结果表明 UC 组大肠杆菌数量显著高于正常组,双歧杆菌和乳酸杆菌数量显著低于正常组。肠道菌群在 UC 中扮演重要角色,多表现为细菌多样性降低、正常菌群的破坏以及致病菌的增加等。

本研究采用 DSS 诱导的 UC 小鼠模型,探讨雷公藤对 UC 小鼠肠道菌群的调节作用。研究结果显示,模型组小鼠与对照组小鼠相比肠道菌群紊乱,菌群丰度降低,经雷公藤治疗之后,肠道菌群的恢复速度加快,与模型组相比,肠道菌群的多样性明显提高,门水平上主要表现为拟杆菌门比例降低,硬壁菌门的升高;属水平上主要表现为毛螺菌和拟杆菌属的减少。这种改变主要由于肠道微环境破坏造成营养要求较高的厌氧菌革兰阴性杆菌大量死亡,而雷公藤治疗后,硬壁菌门细菌比例显著增加,拟杆菌门比例降低,提示经雷公藤治疗后,可以调节 UC 小鼠菌群组成,加快菌群的恢复,肠道菌群结构得到改善。

综上所述,雷公藤可能通过对 UC 小鼠肠道菌群结构的改善,对细菌多样性的恢复,来调节肠道

菌群达到治疗 UC 的效果。本研究为雷公藤治疗 UC 的临床合理使用提供参考。

参考文献

- [1] Prideaux L, Kamm M A, De Cruz P P, *et al.* Inflammatory bowel disease in Asia: A systematic review [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2012, 27(8): 1266-1280.
- [2] 孙中美, 胡立明, 毛堂友, 等. 溃疡性结肠炎中西医治疗进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(11): 171-175.
- [3] 刘笃佳, 王媛媛, 马 旭. 溃疡性结肠炎的流行病学研究进展 [J]. 中国烧伤创疡杂志, 2017, 29(3): 214-217.
- [4] Fedorak R N, Veldhuyzen van Zanten S, Bridges R. Canadian digestive health foundation public impact series: Gastroesophageal reflux disease in Canada: Incidence, prevalence, and direct and indirect economic impact [J]. *Can J Gastroenterol*, 2010, 24(7): 431-434.
- [5] Borody T J, Campbell J. Fecal microbiota transplantation: Current status and future directions [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011, 5(6): 653-655.
- [6] Ordás I, Eckmann L, Talamini M, *et al.* Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2012, 380(9853): 1606-1619.
- [7] Tuci A, Tonon F, Castellani L, *et al.* Fecal detection of *Mycobacterium avium* paratuberculosis using the IS900 DNA sequence in Crohn's disease and ulcerative colitis patients and healthy subjects [J]. *Digest Dis Sci*, 2011, 56(10): 2957-2962.
- [8] Jess T, Simonsen J, Nielsen N M, *et al.* Enteric *Salmonella* or *Campylobacter* infections and the risk of inflammatory Bowel disease [J]. *Gut*, 2011, 60(3): 318-324.
- [9] 牛 敏, 邵天波, 陈瑞春, 等. 溃疡性结肠炎患者肠道菌群分析和细菌毒素基因检测 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2015(4): 514-518.
- [10] Bao J, Dai S M. A Chinese herb *Tripterygium wilfordii* Hook F in the treatment of rheumatoid arthritis: Mechanism, efficacy, and safety [J]. *Rheumatol Int*, 2011, 31(9): 1123-1129.
- [11] Xu X, Li QJ, Xia S, *et al.* Tripterygium glycosides for treating late-onset rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis [J]. *Altern Ther Health Med*, 2016, 22(6): 32-39.
- [12] Jiang M, Zha Q, Zhang C, *et al.* Predicting and verifying outcome of *Tripterygium wilfordii* Hook. F. based therapy in rheumatoid arthritis: From open to double-blinded randomized trial [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 9700.
- [13] Song W, Liu M, Wu J, *et al.* Preclinical pharmacokinetics of triptolide: A potential antitumor drug [J]. *Curr Drug Metabol*,

- 2019, doi: 10.2174/1389200219666180816141506.
- [14] 胡维岳. 雷公藤红素对大鼠肥胖的治疗作用及机制研究 [D]. 南京: 南京医科大学, 2018.
- [15] Zhou Y J, Qin D P, Wang Y D, *et al.* Amelioration of *Tripterygium wilfordii* polycoride on TNBS/Ethanol-induced ulcerative colitis via inhibiting lipid peroxidation and its downstream inflammatory meditors [J]. *Chin Herb Med*, 2017, 9(4): 344-352.
- [16] Murano M, Maemura K, Hirata I, *et al.* Therapeutic effect of intracolonicallly administered nuclear factor kappa B (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis [J]. *Clin Exp Immunol*, 2010, 120(1): 51-58.
- [17] Ekstrom G M. Oxazolone-induced colitis in rats: Effects of budesonide, cyclosporin A, and 5-aminosalicylic acid [J]. *Scand J Gastroenterol*, 1998, 33(2): 174-179.
- [18] Boirivant M, Fuss I J, Ferroni L, *et al.* Oral administration of recombinant cholera toxin subunit B inhibits IL-12-mediated murine experimental (trinitrobenzene sulfonic acid) colitis [J]. *J Immunol*, 2001, 166(5): 3522-3532.
- [19] Nishikawa J, Kudo T, Sakata S, *et al.* Diversity of mucosa-associated microbiota in active and inactive ulcerative colitis [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2009, 44(2): 180-186.
- [20] Macfarlane S, Furrie E, Cummings J H, *et al.* Chemotaxonomic analysis of bacterial populations colonizing the rectal mucosa in patients with ulcerative colitis [J]. *Clin Infect Dis*, 2004, 38(12): 1690-1699.
- [21] 刘志威, 王学群, 李甜甜. 溃疡性结肠炎患者肠道菌群变化的临床意义 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2016, 25(5): 554-556.