

# 白芍总苷对自身免疫性甲状腺炎大鼠肠黏膜屏障及肠道菌群的影响

牧亚峰<sup>1</sup>, 向楠<sup>1,2\*</sup>, 左新河<sup>1,2\*</sup>, 余欣然<sup>3</sup>, 赵勇<sup>2</sup>, 陈继东<sup>1,2</sup>

1. 湖北中医药大学, 湖北 武汉 430061

2. 湖北省中医院 甲状腺疾病诊疗中心, 湖北 武汉 430074

3. 贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550025

**摘要:**目的 探讨白芍总苷对自身免疫性甲状腺炎 (autoimmune thyroiditis, AIT) 大鼠肠道菌群及肠黏膜屏障的影响。方法 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、硒酵母 (36  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 组及白芍总苷低、中、高剂量 (160、320、640  $\text{mg}/\text{kg}$ ) 组, 每组 8 只。采用高碘水喂养联合 sc 猪甲状腺球蛋白与弗氏佐剂诱导 AIT 大鼠模型, 造模后 ig 相应药物, 1 次/d, 连续 6 周。采用 ELISA 法测定各组大鼠血清中甲状腺球蛋白抗体 (thyroglobulin antibodies, TGAb)、甲状腺过氧化物酶抗体 (thyroid peroxidase antibodies, TPOAb)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 和白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10) 水平; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色观察各组大鼠甲状腺和结肠组织病理变化; 采用透射电镜 (TEM) 观察各组大鼠结肠黏膜紧密连接结构; 采用 ELISA 法测定各组大鼠结肠组织分泌型免疫球蛋白 A (secretory immunoglobulin A, sIgA) 水平; 采用 Western blotting 法检测各组大鼠结肠组织闭锁连接蛋白-1 (zonula occludens-1, ZO-1) 和闭合蛋白 (Occludin) 表达情况; 采用 16S rRNA 高通量测序技术检测各组大鼠肠道菌群变化。结果 白芍总苷能够显著降低 AIT 大鼠血清中 TGAb、TPOAb 和 TNF- $\alpha$  水平 ( $P < 0.001$ ), 显著升高血清中 IL-10 水平 ( $P < 0.001$ ), 减轻甲状腺滤泡损伤及结肠黏膜病变程度, 改善结肠黏膜紧密连接超微结构, 显著升高结肠组织中 sIgA 水平 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001), 显著升高结肠组织 ZO-1 和 Occludin 蛋白表达水平 ( $P < 0.01$ 、0.001), 降低肠道菌群生物多样性及丰度指数, 显著降低厚壁菌门相对丰度 ( $P < 0.001$ ), 显著升高拟杆菌门相对丰度 ( $P < 0.001$ ), 显著升高乳酸杆菌属 *Lactobacillus*、普雷沃氏菌属 *Prevotellaceae* 和罗姆布茨菌属 *Romboutsia* 相对丰度 ( $P < 0.05$ 、0.001)。结论 白芍总苷可能通过调节 AIT 大鼠肠道菌群组成及多样性, 改善肠黏膜屏障损伤, 从而发挥治疗 AIT 的作用。

**关键词:** 白芍; 白芍总苷; 自身免疫性甲状腺炎; 肠道菌群; 肠黏膜屏障; 紧密连接

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)11-3269-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.11.014

## Effects of total glucosides of *Paeonia lactiflora* on intestinal mucosal barrier and intestinal flora in rats with autoimmune thyroiditis

MU Ya-feng<sup>1</sup>, XIANG Nan<sup>1,2\*</sup>, ZUO Xin-he<sup>1,2</sup>, YU Xin-ran<sup>3</sup>, ZHAO Yong<sup>2</sup>, CHEN Ji-dong<sup>1,2</sup>

1. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, China

2. Thyroid Disease Treatment Center, Hubei Provincial Hospital of TCM, Wuhan 430074, China

3. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

**Abstract: Objective** To explore the effect of total glucosides of *Paeonia lactiflora* (TGP) on intestinal mucosal barrier and intestinal flora in rats with autoimmune thyroiditis (AIT). **Methods** SD rats were randomly divided into control group, model group, selenium (36  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) group, low-, medium-, high-dose TGP (160, 320, 640  $\text{mg}/\text{kg}$ ) groups. AIT rat model was established by feeding high-iodine water combined with sc porcine thyroglobulin and Freund's adjuvant, and then rats were ig drugs once daily for 6 weeks. ELISA was used to detect levels of thyroglobulin antibody (TGAb), thyroid peroxidase antibody (TPOAb), tumor necrosis

收稿日期: 2020-12-21

基金项目: 国家中医药管理局中医学流派传承工作室建设项目 (LP0117039); 湖北省卫健委中医药科研重点项目 (ZY2019Z007); 湖北省自然科学基金面上项目 (2019CFB800); 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题 (QZYY2019024)

作者简介: 牧亚峰 (1990—), 男, 博士研究生, 研究方向为中医药防治甲状腺疾病。E-mail: muyafeng2021@163.com

\*通信作者: 向楠 (1961—), 女, 博士, 教授, 主要从事中医药防治内分泌及代谢性疾病研究。E-mail: xiangnan61@sina.com

左新河 (1964—), 男, 博士, 教授, 主要从事中医药防治甲状腺疾病研究。E-mail: fl1976@163.com

factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and interleukin-10 (IL-10) in serum of rats in each group; Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of thyroid and colon tissues of rats in each group; Transmission electron microscopy (TEM) was used to observe the tight junction structure of colon mucosa of rats in each group; ELISA was used to detect secretory immunoglobulin A (sIgA) level in colon tissue of rats in each group; Western blotting was used to detect expressions of zonula occludens-1 (ZO-1) and Occludin in colon tissue of rats in each group; 16S rRNA high-throughput sequencing technology was used to detect intestinal flora changes of rats in each group. **Results** TGP significantly reduced levels of TGAb, TPOAb, and TNF- $\alpha$  in serum of AIT rats ( $P < 0.001$ ), increased IL-10 level in serum ( $P < 0.001$ ), alleviated the damage of thyroid follicles and degree of colonic mucosal lesions, improved the ultrastructure of colon tight junctions, increased sIgA level in colon tissue ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ), increased expressions of ZO-1 and Occludin in colon tissue ( $P < 0.01, 0.001$ ), reduced the biological diversity and abundance index of intestinal flora, reduced the relative abundance of firmicutes ( $P < 0.001$ ), increased the relative abundance of bacteroides ( $P < 0.001$ ), increased the relative abundance of *Lactobacillus*, *Prevotellaceae* and *Romboutsia* ( $P < 0.05, 0.001$ ). **Conclusion** TGP may play a therapeutic role in AIT by regulating composition and diversity of intestinal flora and improving intestinal mucosal barrier damage.

**Key words:** *Paeonia lactiflora* Pall.; total glucosides of *P. lactiflora* Pall.; autoimmune thyroiditis; intestinal flora; intestinal mucosal barrier; tight junction

自身免疫性甲状腺炎 (autoimmune thyroiditis, AIT) 又称桥本甲状腺炎, 是最常见的自身免疫性甲状腺疾病。随着病情进展, 20%~30% 患者最终发展为甲状腺功能减退症, 表现为畏寒、心动过缓、便秘、黏液性水肿等典型症状及体征<sup>[1]</sup>。AIT 的病因与发病机制尚未完全阐明, 传统观点认为其发病是遗传、环境、免疫等多因素共同作用的结果<sup>[2]</sup>。肠道是人体重要的消化及免疫器官, AIT 患者肠道菌群物种组成发生改变且多样性增加<sup>[3-4]</sup>。肠黏膜屏障作为机体第一道防线, 在免疫系统中发挥着重要作用。自身免疫性肝炎、糖尿病、炎症性肠病、慢性肾脏病等自身免疫性疾病均存在肠黏膜屏障损伤, 损伤原因涉及细胞因子、肠道菌群、肠道免疫功能等多个方面<sup>[5]</sup>。研究发现 AIT 患者的十二指肠远端肠上皮细胞超微结构形态发生变化<sup>[6]</sup>。肠道菌群与肠黏膜屏障相互作用, 共同维持着肠道稳态, 一旦两者之间平衡被打破, 可能诱发自身免疫性疾病<sup>[7]</sup>。

白芍总苷是白芍 *Paeonia lactiflora* Pall. 的主要有效成分, 具有抗炎、镇痛、保护血管、护肝、调节免疫、抗抑郁、改善学习记忆等作用, 常用于治疗类风湿性关节炎、银屑病、白塞病、过敏性紫癜、变应性鼻炎、强直性脊柱炎等自身免疫性疾病<sup>[8]</sup>。课题组前期研究发现, 白芍总苷能够降低 AIT 大鼠甲状腺自身抗体水平, 减轻甲状腺组织炎症反应, 调节调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg), 从而起到治疗 AIT 的作用<sup>[9-10]</sup>。本研究探讨白芍总苷对 AIT 大鼠肠道菌群及肠黏膜屏障的影响, 为其临床应用提供依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级雌性 SD 大鼠, 6 周龄, 体质量 (110±10) g, 购自三峡大学, 动物许可证号 SCXK (鄂) 2017-0012。动物饲养于湖北中医药大学实验动物中心, 温度 (23±2) °C、相对湿度 (55±10) %、光照 12 h/d, 自由进食饮水。动物实验经湖北中医药大学实验动物中心批准 (批准号 HUCMS 201909008)。

### 1.2 药品与试剂

白芍总苷胶囊 (规格 0.3 g/粒, 每克含芍药苷 347 mg, 批号 H20055058) 购自宁波立华制药有限公司; 硒酵母片 (规格 50 μg/片, 批号 H10940161) 购自牡丹江灵泰药业有限公司; 猪甲状腺球蛋白 (批号 180801)、完全弗氏佐剂 (批号 F5881)、不完全弗氏佐剂 (批号 F5506) 购自美国 Sigma 公司; 甲状腺过氧化物酶抗体 (thyroid peroxidase antibodies, TPOAb) ELISA 试剂盒 (批号 E11199r) 购自武汉华美生物工程有限公司; 甲状腺球蛋白抗体 (thyroglobulin antibodies, TGAb) ELISA 试剂盒 (批号 R0551) 购自南京森贝伽生物科技有限公司; 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10)、分泌型免疫球蛋白 A (secretory immunoglobulin A, sIgA) ELISA 试剂盒 (批号分别为 R2856c、R0016c、R0875c) 购自武汉伊莱瑞特生物公司; 闭锁连接蛋白-1 (zonula occludens-1, ZO-1) 抗体 (批号 A0659) 购自 Abclonal 公司; 闭合蛋白 (Occludin) 抗体 (批号 13409-1-AP) 购自武汉三鹰生物技术有限公司;

$\beta$ -actin 抗体(批号 BM0627)、山羊抗小鼠二抗(批号 BA1051)、山羊抗兔二抗(批号 BA1054)购自武汉博士德生物工程有限公司;DNA 提取试剂盒购自美国 Omega 公司;TransStart Fastpfu DNA Polymerase 购自北京 TransGen 公司;DNA 凝胶回收试剂盒购自美国 Axygen 公司。

### 1.3 仪器

H1650-W 离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司);Flexstation3 多功能酶标仪(美国 MD 公司);RM2016 轮转式切片机(德国 Leica 公司);DYCZ-40 电转仪(北京六一仪器厂);BX53 型生物显微镜(日本 Olympus 公司);HT7700-SS 透射电镜(TEM, 日本 HITACHI 公司);NanoDrop2000 分光光度计(美国赛默飞公司);QuantStudio6 PCR 仪(美国 ABI 公司);Miseq PE300 测序仪(美国 Illumina 公司)。

## 2 方法

### 2.1 造模、分组与给药

大鼠适应性饲养 1 周后,随机选取 8 只作为对照组,其余大鼠采用猪甲状腺球蛋白与弗氏佐剂免疫注射联合高碘水喂养制备 AIT 大鼠模型<sup>[11]</sup>。第 2~7 周大鼠 sc 100  $\mu$ g 猪甲状腺球蛋白,1 次/周,进行 2 次初次免疫和 4 次加强免疫,同时给予碘化钠水(0.64 g/L)喂养,建立 AIT 模型。造模大鼠随机分为模型组、硒酵母(36  $\mu$ g/kg,相当于临床等效剂量)组及白芍总苷低、中、高剂量(160、320、640 mg/kg,分别相当于临床等效剂量的 1、2、4 倍)组,每组 8 只<sup>[12]</sup>。硒酵母片研磨至极细粉末,溶于生理盐水配制成质量浓度为 3.6  $\mu$ g/mL 的混悬液;白芍总苷胶囊溶于生理盐水,分别配制成质量浓度为 16、32、64 mg/mL 的溶液。自第 7 周开始,各给药组 ig 相应药物,对照组和模型组 ig 等体积生理盐水,1 次/周,连续 6 周。

### 2.2 白芍总苷对 AIT 大鼠血清 TGAb、TPOAb、TNF- $\alpha$ 和 IL-10 水平的影响

给药结束后,大鼠禁食不禁水 12 h,ip 10%水合氯醛麻醉后取血,离心取血清,按试剂盒说明书测定血清中 TGAb、TPOAb、TNF- $\alpha$  和 IL-10 水平。

### 2.3 白芍总苷对 AIT 大鼠甲状腺和结肠病理变化的影响

大鼠取血完毕后,快速分离甲状腺和结肠组织,以生理盐水清洗,切成厚度为 0.2~0.3 cm 的组织块,于 4%多聚甲醛中固定 24~48 h,梯度酒精脱水,常规石蜡包埋并制成厚度为 4  $\mu$ m 的切

片,进行苏木素-伊红(HE)染色,于显微镜下观察并拍照。

### 2.4 白芍总苷对 AIT 大鼠结肠黏膜紧密连接超微结构的影响

取各组结肠组织,于 2.5%戊二醛中固定,用 PBS 缓冲液反复冲洗,于 1%锇酸室温固定 2 h,常规梯度酒精脱水,丙酮渗透,环氧树脂包埋,60~80 nm 超薄切片,进行铅钨双染色,于 TEM 下观察结肠组织紧密连接、上皮微绒毛等超微结构并拍照。

### 2.5 白芍总苷对 AIT 大鼠结肠组织 sIgA 水平的影响

取各组结肠组织,剪碎后用匀浆机制备匀浆液,3000 r/min 离心 10 min,取上清液,按试剂盒说明书测定结肠组织中 sIgA 水平。

### 2.6 白芍总苷对 AIT 大鼠结肠组织 ZO-1 和 Occludin 蛋白表达的影响

取各组结肠组织,剪碎后加入磷酸酶抑制剂,裂解后匀浆,4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 5 min,取上清液,采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度。蛋白样品经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,于脱脂牛奶中封闭 2 h,加入 ZO-1 和 Occludin 抗体(1:1000),4  $^{\circ}$ C 孵育过夜;TBST 洗涤,加入山羊抗小鼠/兔二抗(1:50 000),37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h;加入 ECL 发光液显影曝光,扫描胶片,采用 BandScan 软件分析。

### 2.7 粪便菌群 DNA 的提取及测序

每组随机选取 5 只大鼠,肛周消毒后固定并将其尾部提起,手指按压下腹部促使排便,收集粪便 2~3 颗于灭菌冻存管。按试剂盒说明书进行微生物群落总 DNA 抽提,利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量,使用 NanoDrop2000 测定 DNA 质量浓度和纯度。使用扩增引物 338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和 806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对 16S rRNA V3~4 可变区进行 PCR 扩增,扩增程序:95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min,27 个循环(95  $^{\circ}$ C 变性 30 s、55  $^{\circ}$ C 退火 30 s、72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s),72  $^{\circ}$ C 稳定延伸 10 min,4  $^{\circ}$ C 保存。扩增结果用 2%琼脂糖凝胶电泳回收,利用 DNA 凝胶试剂盒对回收产物纯化,2%琼脂糖凝胶电泳检测,并对回收产物进行检测定量。使用 NEXTFLEX Rapid DNA-Seq Kit 建库,利用 MiSeq PE300 平台进行高通量测序。利用生物信息学方法进行分类操作单元(operational taxonomic units,

OTUs) 聚类 (物种注释及丰度分析)、物种多样性、物种分类学组成等分析。

### 2.8 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行数据分析, 实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 数据符合正态分布且方差齐。多组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 事后多重比较用 LSD 法。

## 3 结果

### 3.1 白芍总苷对 AIT 大鼠血清中 TGAb、TPOAb、TNF- $\alpha$ 和 IL-10 水平的影响

如图 1 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 TGAb、TPOAb 和 TNF- $\alpha$  水平均显著升高 ( $P < 0.001$ ), IL-10 水平明显降低 ( $P < 0.001$ ); 与模型组比较, 各给药组大鼠血清中 TGAb、TPOAb、TNF- $\alpha$  水平均明显降低 ( $P < 0.001$ ), IL-10 水平均显著升高 ( $P < 0.001$ )。

### 3.2 白芍总苷对 AIT 大鼠甲状腺和结肠组织病理变化的影响

如图 2 所示, 对照组大鼠甲状腺滤泡结构完整, 形态规则, 呈类圆形, 滤泡上皮细胞呈单层立方, 排列整齐, 滤泡腔内充满胶质, 滤泡间隙未见淋巴

细胞浸润; 模型组大鼠甲状腺滤泡上皮细胞呈扁平状, 大部分滤泡结构破坏萎缩, 可见淋巴细胞浸润; 硒酵母组大鼠甲状腺滤泡上皮细胞排列整齐, 滤泡腔萎缩, 胶质含量减少, 可见吸收空泡; 白芍总苷各剂量组大鼠甲状腺滤泡结构完整性改善, 淋巴细胞浸润明显减少, 病变程度有所减轻。

对照组大鼠结肠黏膜完整, 上皮细胞排列整齐, 黏膜隐窝平行排列, 杯状细胞丰富, 无淋巴细胞浸润; 模型组大鼠结肠黏膜上皮部分断裂、不完整, 黏膜隐窝形态扭曲, 伴有淋巴细胞浸润; 各给药组结肠黏膜完整性有所恢复, 淋巴细胞浸润明显减少。

### 3.3 白芍总苷对 AIT 大鼠结肠黏膜紧密连接超微结构的影响

如图 3 所示, 对照组大鼠结肠黏膜细胞间紧密连接结构完整, 连接致密、连续, 桥粒密度较高, 上皮细胞表面微绒毛正常; 模型组结肠黏膜细胞间紧密连接出现部分断裂, 连接开放、疏松, 桥粒密度下降, 微绒毛数量减少, 且排列较紊乱; 各给药组结肠黏膜细胞间紧密连接的连续性均有不同程度恢复, 连接更加紧密, 肠上皮微绒毛数量增加, 排列较模型组整齐。

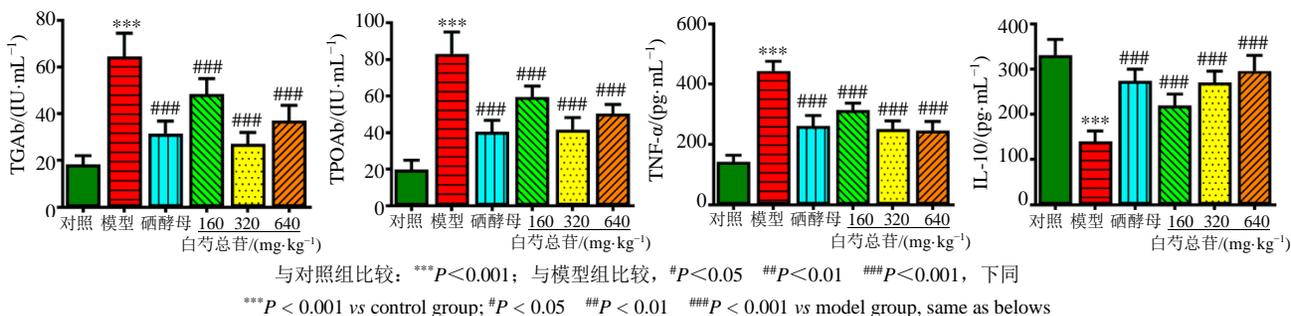


图 1 白芍总苷对 AIT 大鼠血清 TGAb、TPOAb、TNF- $\alpha$  和 IL-10 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 1 Effect of total glucosides of *P. lactiflora* on TGAb, TPOAb, TNF- $\alpha$  and IL-10 levels in serum of AIT rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

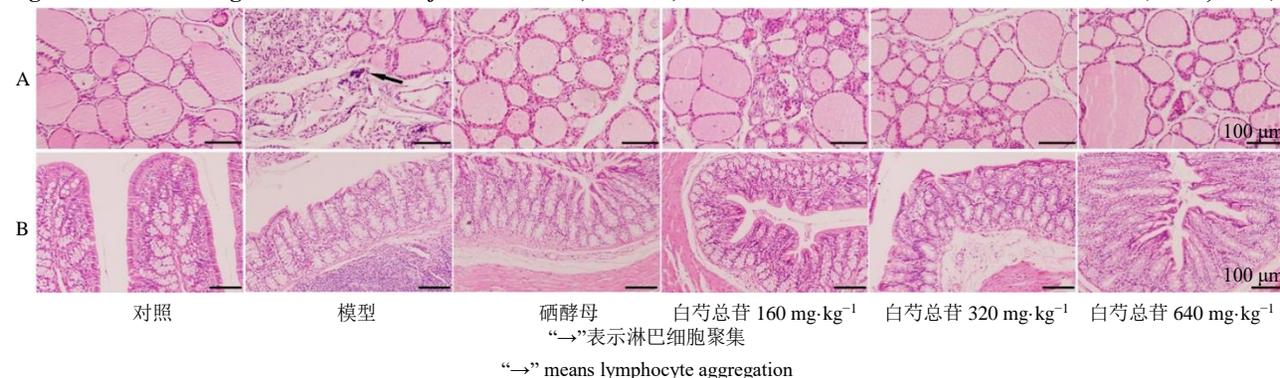


图 2 白芍总苷对 AIT 大鼠甲状腺 (A) 和结肠组织 (B) 病理变化的影响 (HE,  $\times 100$ )

Fig. 2 Effect of total glucosides of *P. lactiflora* on pathological changes of thyroid tissues and colon tissues in AIT rats (HE,  $\times 100$ )

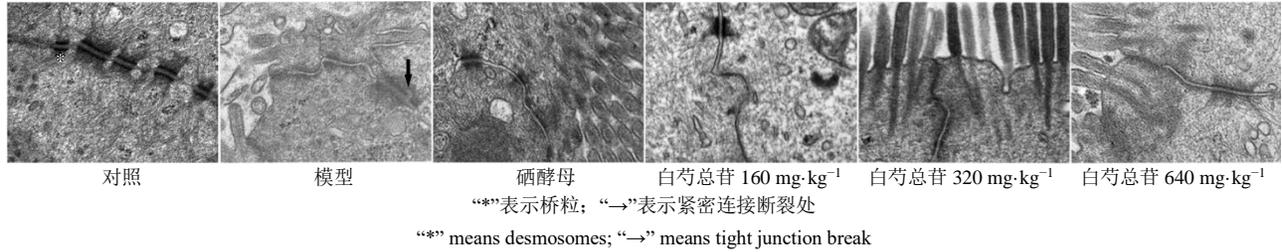


图3 白芍总苷对AIT大鼠结肠黏膜紧密连接超微结构的影响 (×12 000)

Fig. 3 Effect of total glucosides of *P. lactiflora* on tight junction structure of colonic mucosa in AIT rats (× 12 000)

### 3.4 白芍总苷对AIT大鼠结肠组织中sIgA水平的影响

如图4所示,与对照组比较,模型组大鼠结肠组织中sIgA水平显著降低 ( $P < 0.001$ );与模型组比较,各给药组大鼠结肠组织sIgA水平均显著升高 ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ )。

### 3.5 白芍总苷对AIT大鼠结肠组织ZO-1和Occludin蛋白表达的影响

如图5所示,与对照组比较,模型组大鼠结肠组织中ZO-1和Occludin蛋白表达水平均显著降低

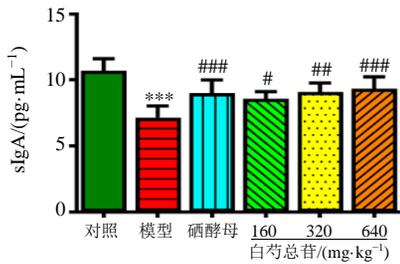


图4 白芍总苷对AIT大鼠结肠组织sIgA水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 4 Effect of total glucosides of *P. lactiflora* on sIgA level in colon tissues of AIT rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

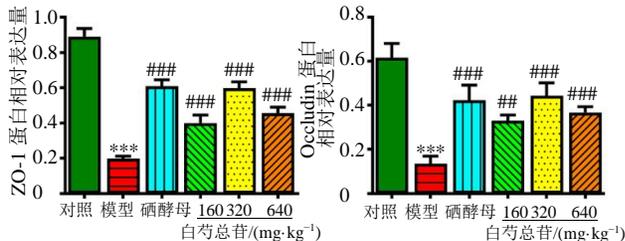
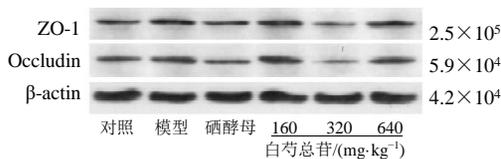


图5 白芍总苷对AIT大鼠结肠ZO-1和Occludin蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 5 Effect of total glucosides of *P. lactiflora* on expressions of ZO-1 and Occludin in colon tissues of AIT rats ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

( $P < 0.001$ );与模型组比较,各给药组大鼠结肠组织ZO-1和Occludin蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.01, 0.001$ )。

### 3.6 白芍总苷对AIT大鼠肠道菌群的影响

**3.6.1 物种多样性分析** 本研究对大鼠粪便样品进行测序及分析后,共得到798 330条有效序列。如图6所示,当Shannon指数达到3.5时,各样本稀释曲线趋向平坦,表明测序数据足够大,能够反映样本中绝大多数的微生物多样性信息。 $\alpha$ 多样性反映微生物群落的丰富度和多样性,如表1所示,与对照组相比,模型组大鼠肠道菌群OTUs、Shannon、Simpson、Chao和Ace指数均呈上升趋势;与模型组比较,酵母组大鼠肠道菌群OTUs、Shannon、Chao和Ace指数均呈上升趋势,白芍总苷中、高剂量组大鼠肠道菌群OTUs、Chao和Ace指数均显著降低 ( $P < 0.05, 0.001$ )。表明AIT大鼠肠道菌群物种多样性增加、丰度升高,肠道菌群过度生长,白芍总苷能够降低大鼠肠道菌群多样性。

$\beta$ 多样性通过分析不同样本的物种多样性,探索不同组样本微生物群落的差异性。主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA)是 $\beta$ 多样性具有代表性的一种非约束性数据降维分析方法,样品间距离越近,表明物种组成结构越相似。如图7所示,对照组和模型组在PC1水平上明显分开,表

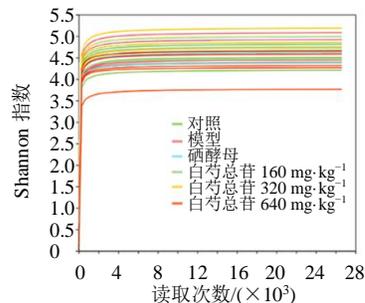


图6 各组大鼠肠道菌群稀释曲线分析 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 6 Rarefaction curve analysis on intestinal flora of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

表 1 各组大鼠肠道菌群 α 多样性指数 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 1 Alpha diversity index of intestinal flora in rats of each group ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量	OTUs	物种多样性		物种丰度	
			Shannon 指数	Simpson 指数	Chao 指数	Ace 指数
对照	—	669.0 ± 46.3	4.62 ± 0.26	0.027 ± 0.008	819.4 ± 56.6	812.0 ± 50.2
模型	—	708.0 ± 55.8	4.66 ± 0.31	0.028 ± 0.008	867.2 ± 67.4	855.9 ± 57.8
硒酵母	36 μg·kg <sup>-1</sup>	721.2 ± 44.9	4.67 ± 0.22	0.027 ± 0.009	904.9 ± 60.3	899.2 ± 65.6
白芍总苷	160 mg·kg <sup>-1</sup>	653.0 ± 49.0	4.67 ± 0.22	0.026 ± 0.007	796.9 ± 45.8	818.3 ± 43.9
	320 mg·kg <sup>-1</sup>	609.0 ± 37.2 <sup>#</sup>	4.50 ± 0.25	0.023 ± 0.007	749.2 ± 52.8 <sup>#</sup>	745.9 ± 49.5 <sup>#</sup>
	640 mg·kg <sup>-1</sup>	537.6 ± 46.3 <sup>###</sup>	4.32 ± 0.23	0.020 ± 0.003	677.2 ± 44.5 <sup>###</sup>	671.8 ± 49.9 <sup>###</sup>

与模型组比较: <sup>#</sup>*P* < 0.05 <sup>###</sup>*P* < 0.001

<sup>#</sup>*P* < 0.05 <sup>###</sup>*P* < 0.001 vs model group

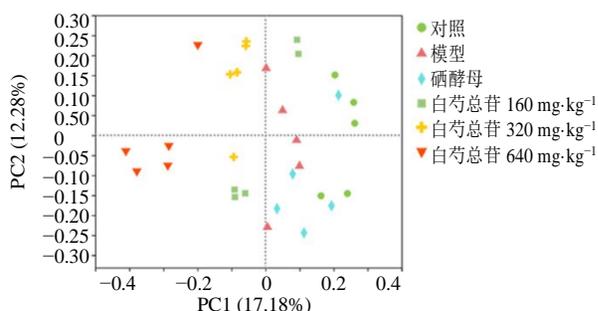


图 7 各组大鼠肠道菌群 PCoA 分析 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 7 PCoA analysis on intestinal flora of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

明 AIT 大鼠肠道菌群组成结构较对照组有明显改变; 各给药组在 PC1 水平上明显偏离模型组, 表明各给药组大鼠肠道菌群组成结构发生明显变化。

3.6.2 群落结构组成分析 如图 8 所示, 在门水平上, 各组大鼠肠道菌群主要包括厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门、放线菌门等, 对照组大鼠肠道菌群

中厚壁菌门、拟杆菌门为优势菌门。与对照组相比, 模型组厚壁菌门相对丰度显著升高 (*P* < 0.001), 拟杆菌门相对丰度显著降低 (*P* < 0.001), 厚壁菌门与拟杆菌门比值 (F/B) 显著升高 (*P* < 0.001); 与模型组比较, 各给药组厚壁菌门相对丰度显著降低 (*P* < 0.001), 拟杆菌门相对丰度明显升高 (*P* < 0.001), F/B 显著降低 (*P* < 0.001)。

如图 9 所示, 在属水平上, 各组大鼠肠道菌群主要包括 *Muribaculaceae*、毛螺菌属 *Lachnospiraceae*、瘤胃球菌属 *Ruminococcaceae*、拟杆菌属 *Bacteroides*、乳酸杆菌属 *Lactobacillus*、罗姆布茨菌属 *Romboutsia*、*Turcibacter*、普雷沃氏菌属 *Prevotellaceae*、克里斯滕森菌属 *Christensenellaceae* 等, 其中乳酸杆菌属、普雷沃氏菌属与罗姆布茨菌属组间变化明显。与对照组相比, 模型组乳酸杆菌属、普雷沃氏菌属和罗姆布茨菌属相对丰度显著降低 (*P* < 0.001); 与模型组相比, 硒

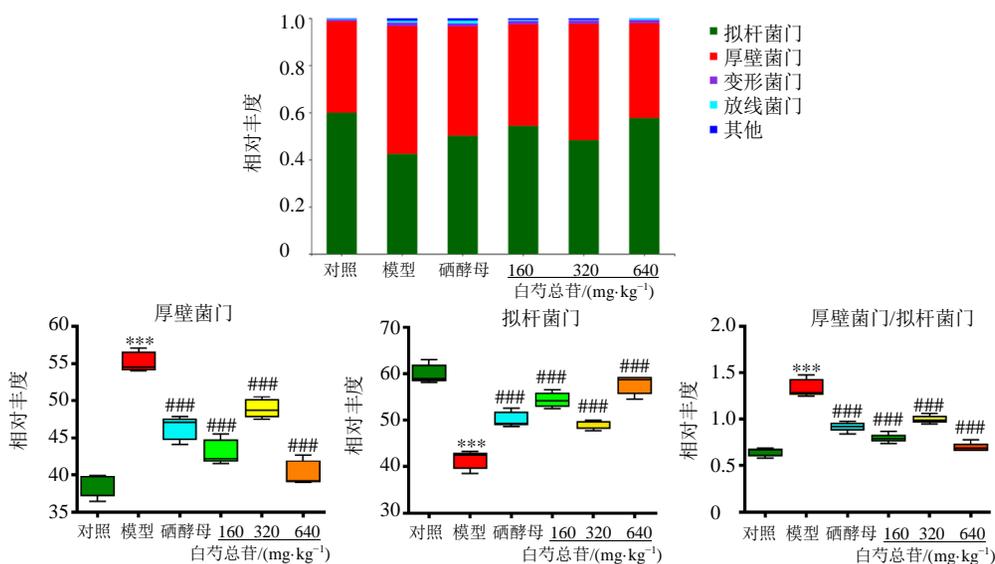


图 8 门水平具有显著差异的肠道菌群相对丰度 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 8 Relative abundance of intestinal flora with significant differences at phylum level ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

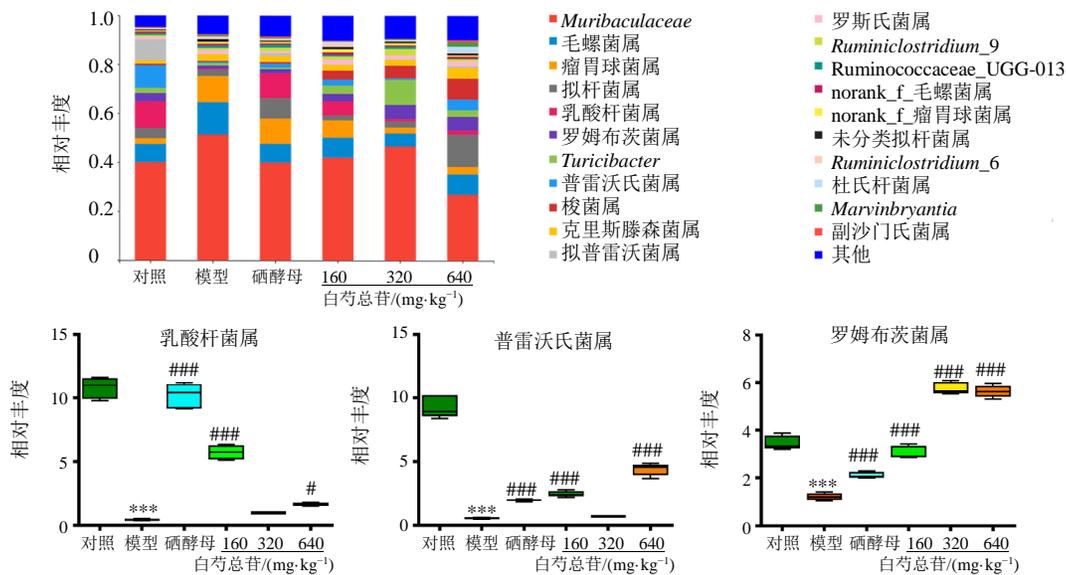


图9 属水平具有显著差异的肠道菌群相对丰度 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 9 Relative abundance of intestinal flora abundance with significant differences at genus level ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

酵母组及白芍总苷低、高剂量组乳酸杆菌属、普雷沃氏菌属和罗姆布茨菌属相对丰度均明显增加 ( $P < 0.05, 0.001$ ), 白芍总苷中剂量组罗姆布茨菌属相对丰度显著升高 ( $P < 0.001$ )。

#### 4 讨论

本研究采用高碘水喂养联合异原性抗原免疫法复制 AIT 大鼠模型, 模型组大鼠血清 TGAb 和 TPOAb 水平显著升高, 且甲状腺组织滤泡结构破坏, 表明造模成功。补硒治疗可以有效降低血清 TPOAb 水平, 由于硒酵母安全性高、临床使用范围广, 本研究将其作为阳性对照药物<sup>[9]</sup>。结果显示, 白芍总苷显著降低 AIT 大鼠血清 TGAb 和 TPOAb 水平, 改善甲状腺组织病理形态, 与前期研究结果基本一致<sup>[9]</sup>; 白芍总苷显著降低血清中促炎细胞因子 TNF- $\alpha$  水平, 升高抗炎细胞因子 IL-10 水平, 纠正炎症反应稳态失衡; 白芍总苷能够调节 AIT 大鼠肠道菌群组成, 升高结肠组织 sIgA、ZO-1 和 Occludin 蛋白表达水平, 改善结肠黏膜屏障中肠上皮结构及紧密连接超微结构。

多种自身免疫性疾病中肠道菌群组成与功能均发生变化, 肠道菌群紊乱可加重免疫发病进程<sup>[13]</sup>, 疾病进展又可反向加剧肠道菌群紊乱程度<sup>[14]</sup>。甲状腺外周稳态对微生物变化敏感, 自身免疫性甲状腺疾病的发生发展可能受到肠道菌群组成变化的影响<sup>[15]</sup>。厚壁菌和拟杆菌占肠道菌群的 90% 以上, 是哺乳动物的优势菌群<sup>[16]</sup>。F/B 与某些病理状况相关, 被认为是肠道菌群健康的重要指标<sup>[17]</sup>。本研究发现

AIT 大鼠肠道厚壁菌门相对丰度显著升高, 拟杆菌门相对丰度降低, F/B 上升, 表明 AIT 大鼠肠道菌群门水平物种比例失调, 菌群呈紊乱态势, 与文献报道一致<sup>[3]</sup>; 白芍总苷组大鼠肠道厚壁菌门相对丰度降低, 拟杆菌门相对丰度升高, F/B 水平降低, 门水平菌群紊乱被纠正。在属水平上, 乳酸杆菌属、普雷沃氏菌属和罗姆布茨菌属相对丰度均下降, 与 AIT 患者肠道菌群分析结果一致<sup>[4]</sup>。乳酸杆菌是益生菌的重要来源, 能够通过分泌乳酸、过氧化氢、细菌素等物质降低肠道 pH, 具有杀菌或抑制病原菌黏附、感染的作用<sup>[18]</sup>。乳酸杆菌能够降低 TNF- $\alpha$  水平, 提高 IL-10 水平, 并参与调节 sIgA 的分泌<sup>[19-20]</sup>。普雷沃氏菌具有定植性和低致病性, 在哮喘、慢性阻塞性肺疾病中相对丰度较低<sup>[21]</sup>; 普雷沃氏菌能够利用富含纤维的碳水化合物产生短链脂肪酸, 从而发挥抗炎作用<sup>[22]</sup>。白芍总苷低剂量组大鼠肠道乳酸杆菌属相对丰度增加, 但乳酸杆菌属对中、高剂量白芍总苷反应不敏感, 可能由于随着肠道中药物的积累, 肠道菌群生长受到抑制, 导致菌群多样性及相对丰度下降。

肠黏膜屏障主要由机械屏障、免疫屏障、微生物屏障和化学屏障构成<sup>[23]</sup>, 是抵抗有害病原体的第一道防线, 对维持机体内环境的稳定起着重要作用<sup>[24]</sup>。机械屏障由肠黏膜上皮细胞、紧密连接等组成, 其中紧密连接是维持肠黏膜机械屏障功能完整的重要结构<sup>[25]</sup>。紧密连接蛋白主要包括以 Occludin 为代表的跨膜蛋白和以 ZO-1 为代表的胞浆蛋白,

Occludin 胞间两两相连形成吻合结构而封闭细胞间隙, ZO-1 与前者相互连接, 使紧密连接形成网状结构而更加稳定。sIgA 是肠黏膜免疫屏障的重要组成部分, 与体液及细胞免疫共同发挥局部免疫功能<sup>[26]</sup>, 具有增强肠道免疫、阻止条件致病菌增殖及病原菌入侵、恢复肠道微生态平衡的作用<sup>[27]</sup>。本研究结果显示, AIT 大鼠结肠组织 sIgA、ZO-1 和 Occludin 蛋白表达水平显著降低, 结肠黏膜紧密连接超微结构部分断裂伴不连续, 表明紧密连接完整性受损, 肠黏膜屏障功能失常; 白芍总苷组大鼠结肠组织 sIgA、ZO-1 和 Occludin 蛋白表达水平上调, 结肠黏膜紧密连接超微结构有不同程度恢复, 表明肠黏膜屏障功能损伤得到改善。肠道菌群中的正常菌群依靠定殖能力紧密黏附在肠黏膜上, 构成了肠道的微生物屏障<sup>[28]</sup>。肠道菌群紊乱可直接损伤微生物屏障, 稳态失衡的肠道菌群进而引起一系列复杂的病理反应。同时, 肠道菌群的组成受到黏膜免疫系统的监视, 细胞间紧密连接功能的强弱又可通过影响肠黏膜通透性决定菌群抗原是否暴露, 肠道菌群、紧密连接、肠黏膜免疫屏障之间的相互协调作用有助于维持肠道稳态<sup>[29]</sup>。此外, 短链脂肪酸、胆汁酸、吲哚等各类肠道菌群代谢产物在免疫调节和疾病发生中有着不可忽视的作用<sup>[30]</sup>, 因此, 肠道菌群代谢产物的变化有待进一步研究。

综上所述, 白芍总苷能够降低 AIT 大鼠甲状腺自身抗体水平, 调控炎症因子及 sIgA, 减轻甲状腺滤泡损伤及结肠黏膜病变程度, 改善结肠紧密连接超微结构, 增加结肠紧密连接蛋白表达水平, 调节肠道菌群生物多样性及物种组成, 改善肠黏膜屏障损伤, 从而起到治疗 AIT 的作用。课题组后续将深入探究乳杆菌等肠道优势菌对 AIT 大鼠甲状腺自身抗体、细胞因子、肠黏膜屏障损伤的作用。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Caturegli P, De Remigis A, Rose N R. Hashimoto thyroiditis: Clinical and diagnostic criteria [J]. *Autoimmun Rev*, 2014, 13(4/5): 391-397.
- [2] Rodríguez Y, Rojas M, Monsalve D M, et al. Latent autoimmune thyroid disease [J]. *J Transl Autoimmun*, 2020, 3: 100038.
- [3] Ishaq H M, Mohammad I S, Guo H, et al. Molecular estimation of alteration in intestinal microbial composition in Hashimoto's thyroiditis patients [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 95: 865-874.
- [4] Zhao F Y, Feng J, Li J, et al. Alterations of the gut microbiota in Hashimoto's thyroiditis patients [J]. *Thyroid*, 2018, 28(2): 175-186.
- [5] 褚宇瑶, 戴岳. 肠黏膜屏障及其与多种疾病相关性的研究进展 [J]. *中国现代医药杂志*, 2020, 22(7): 102-105.
- [6] Sasso F C, Carbonara O, Torella R, et al. Ultrastructural changes in enterocytes in subjects with Hashimoto's thyroiditis [J]. *Gut*, 2004, 53(12): 1878-1880.
- [7] 黄艳芬, 刘湘红, 伍浩, 等. 肠黏膜屏障与肠道菌群的相互关系 [J]. *中国微生态学杂志*, 2019, 31(12): 1465-1469.
- [8] 余欣然, 曹峰, 陈云志. 白芍总苷在自身免疫性疾病中的运用进展 [J]. *中医药学报*, 2019, 47(1): 127-130.
- [9] 牧亚峰. 白芍总苷对自身免疫性甲状腺炎大鼠免疫调节机制的研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2018.
- [10] 余欣然, 向楠, 李家园, 等. 白芍总苷胶囊对自身免疫性甲状腺炎模型大鼠 Treg 细胞的影响 [J]. *云南中医学院学报*, 2017, 40(6): 5-8.
- [11] 孙崑, 宋光华, 贺斌. 碘和甲状腺球蛋白诱导大鼠实验性自身免疫性甲状腺炎的研究 [J]. *中华内科杂志*, 2000, 39(12): 841.
- [12] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 1698.
- [13] Zhang X, Chen B D, Zhao L D, et al. The gut microbiota: Emerging evidence in autoimmune diseases [J]. *Trends Mol Med*, 2020, 26(9): 862-873.
- [14] Welch J L M, Hasegawa Y, McNulty N P, et al. Spatial organization of a model 15-member human gut microbiota established in gnotobiotic mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(43): 9105-9114.
- [15] Virili C, Fallahi P, Antonelli A, et al. Gut microbiota and Hashimoto's thyroiditis [J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2018, 19(4): 293-300.
- [16] Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome [J]. *Nature*, 2012, 486(7402): 207-214.
- [17] Li W, Ma Z S. FBA ecological guild: Trio of firmicutes-bacteroidetes alliance against actinobacteria in human oral microbiome [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 287.
- [18] Mokoena M P. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review [J]. *Molecules*, 2017, 22(8): 1255.
- [19] Wang P P, Li Y, Xiao H, et al. Isolation of *Lactobacillus reuteri* from Peyer's patches and their effects on SIgA production and gut microbiota diversity [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2016, 60(9): 2020-2030.

- [20] Reyes-Díaz A, Mata-Haro V, Hernández J, *et al.* Milk fermented by specific *Lactobacillus* strains regulates the serum levels of IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-10 cytokines in a LPS-stimulated murine model [J]. *Nutrients*, 2018, 10(6): 691.
- [21] Larsen J M. The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease [J]. *Immunology*, 2017, 151(4): 363-374.
- [22] Mangalam A K, Murray J. Microbial monotherapy with *Prevotella histicola* for patients with multiple sclerosis [J]. *Expert Rev Neurother*, 2019, 19(1): 45-53.
- [23] 袁榴翼, 李小锦, 尹清晟, 等. 中药干预肠道菌群改善肠黏膜屏障功能的研究进展 [J]. *中草药*, 2018, 49(8): 1932-1938.
- [24] Okumura R, Takeda K. Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis [J]. *Exp Mol Med*, 2017, 49(5): 338.
- [25] Diaz-Coranguéz M, Liu X, Antonetti D A. Tight junctions in cell proliferation [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(23): 5972.
- [26] Li Y, Jin L, Chen T X. The effects of secretory IgA in the mucosal immune system [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 2032057.
- [27] 郭佳裕, 孟娟, 杜锦辉. 甘草泻心汤对抗生素诱导肠道菌群失调小鼠肠道主要菌群及 sIgA 的影响 [J]. *中国微生态学杂志*, 2019, 31(11): 1246-1249.
- [28] Huang X Z, Zhu L B, Li Z R, *et al.* Bacterial colonization and intestinal mucosal barrier development [J]. *World J Clin Pediatr*, 2013, 2(4): 46-53.
- [29] Fan H, Wang A Y, Wang Y, *et al.* Innate lymphoid cells: Regulators of gut barrier function and immune homeostasis [J]. *J Immunol Res*, 2019, 2019: 2525984.
- [30] Ohno H. The impact of metabolites derived from the gut microbiota on immune regulation and diseases [J]. *Int Immunol*, 2020, 32(10): 629-636.

[责任编辑 李亚楠]