

基于肠道菌群探究一贯煎多糖的结构及改善小鼠肝纤维化作用

魏霞^{1,2,3}, 王星星¹, 方勤勤², 徐莹^{2,3}, 秦路平¹, 刘平³, 刘伟^{2,3*}, 吴建军^{1*}

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

2. 上海中医药大学附属曙光医院药学部, 国家中医药管理局中药制剂三级实验室, 上海 201203

3. 上海中医药大学附属曙光医院肝肾疾病病证教育部重点实验室, 上海市中医临床重点实验室, 上海 201203

摘要: 目的 探究一贯煎多糖(YGJP-W)的基本结构特征以及其改善四氯化碳(CCl₄)诱导小鼠肝纤维化的活性, 分析 YGJP-W 抗肝纤维化活性与其调节肠道菌群结构变化关系。方法 采用水提醇沉和弱阴离子交换色谱制备一贯煎多糖组分 YGJP-W, 依次采用苯酚-硫酸法、间羟基联苯法、BCA 蛋白定量分析试剂盒、高效凝胶渗透色谱法(high performance gel permeation chromatography, HPGPC)、FT-IR、离子色谱仪及扫描电镜法(scanning electron microscope, SEM)对一贯煎多糖的总糖含量、糖醛酸含量、蛋白含量、相对分子质量分布、官能团、单糖组成及形貌特征进行表征, 采用 CCl₄ 诱导的小鼠模型, 检测 YGJP-W (50、100 mg/kg) 干预 3 周后的小鼠血清谷丙转氨酶、谷草转氨酶及肝组织羟脯氨酸水平, 并通过 HE 染色和天狼猩红染色观察肝脏组织学变化, 评价 YGJP-W 改善肝纤维化活性; 采用 16S rDNA 测序技术评价 YGJP-W 对小鼠肠道菌群的影响; 采用抗生素联合 YGJP-W 干预, 评价 YGJP-W 是否通过调节肠道菌群发挥药效作用。结果 YGJP-W 总得率为 11.60%, 总糖质量分数为 92.48%, 至少由相对分子质量为 1.74×10^5 和 5.6×10^3 的 2 种多糖组成, 单糖组成包含半乳糖、葡萄糖、甘露糖和果糖, 其物质的量比为 1.0 : 2.8 : 1.4 : 1.6。YGJP-W 干预 3 周后, 能够显著改善 CCl₄ 引起的肝功能异常、肝组织病理损伤、胶原沉积和纤维化。YGJP-W 在改善肝纤维化的同时能够引起小鼠肠道菌群结构变化, 在门水平上, YGJP-W 显著性降低拟杆菌门丰度[(57.4±14.6)% vs (79.3±8.1)%, $P < 0.01$], 增加变形菌门[(10.4±4.7)% vs (2.1±1.9)%, $P < 0.01$]和放线菌门[(3.7±2.4)% vs (0.3±0.1)%, $P < 0.01$]丰度, 在属水平上, YGJP-W 增加狄氏副拟杆菌属 *Parabacteroides*、埃希氏菌-志贺氏菌属 *Escherichia-Shigella*、活泼瘤胃球菌属 *Ruminococcus_gnavus_group*、萨特氏菌属 *Sutterella*、毛螺菌属 NK4A136 组 *Lachnospiraceae_NK4A136_group* 和梭杆菌属 *Fusobacterium* 共 6 个菌属的丰度(LDA score>3, $P < 0.01$), 降低拟普雷沃氏菌属 *Alloprevotella*, 肠鼠杆菌属 *Muribaculum*, 普雷沃氏菌属 *UCG-001 Prevotellaceae_UCG-001* 和另枝杆菌 *Alistipes* 共 4 个菌属的丰度(LDA score>3, $P < 0.01$)。抗生素联合 YJGP-W 干预, YJGP-W 抗肝纤维化的活性显著减弱。结论 多糖类成分 YJGP-W 是一贯煎抗肝纤维化的重要物质基础, YJGP-W 发挥抗肝纤维化的作用可能与其调控肠道菌群相关。

关键词: 一贯煎; 多糖; 肝纤维化; 16S rRNA 基因测序; 肠道菌群

中图分类号: R284.1; R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)04-1110-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.04.006

Exploration on structure and anti-liver fibrosis effect in mice of Yiguan Decoction polysaccharides based on gut microbiota

WEI Xia^{1,2,3}, WANG Xingxing¹, FANG Qinqin², XU Ying^{2,3}, QIN Luping¹, LIU Ping¹, LIU Wei^{2,3}, WU Jianjun¹

1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. Grade Three Laboratory of Traditional Chinese Medicine Preparations of National Administration of Traditional Chinese Medicine, Department of pharmacy, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

3. Key Laboratory of Liver and Kidney Diseases, Ministry of Education, Shanghai Key Laboratory of Traditional Chinese Clinical Medicine, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

收稿日期: 2024-01-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(82130120); 国家自然科学基金项目(82004162); 国家自然科学基金项目(U23A20516); 上海市科技创新行动计划项目(20S21902600); 上海市复方中药重点实验室(上海中医药大学)开放课题基金(21DZ2270500)

作者简介: 魏霞, 女, 博士研究生, 研究方向为中医药防治慢性肝病基础研究。E-mail: weixia_1997@sina.com

*通信作者: 刘伟, 男, 副研究员, 研究方向为中药复方药效物质基础及体内过程研究。E-mail: lwhzayl@163.com

吴建军, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药资源品质评价与开发利用。E-mail: wjjpharmacy@163.com

Abstract: Objective To evaluate the structural characterization of Yiguan Decoction polysaccharides (YJGP-W) and its effects on carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver fibrosis in mice, and to explore the relationship between the anti-liver fibrosis effect of YJGP-W and its regulation of gut microbiota structure. **Methods** YJGP-W was prepared by boiling water extraction, alcohol precipitation, and diethylaminoethyl-Sepharose Fast Flow anion exchange chromatography. The total sugar content, uronic acid content, protein content, molecular weight distribution, functional group composition, monosaccharide composition and morphological characteristics of YJGP-W were investigated by phenol-sulfuric acid method, m-hydroxy-biphenyl method, BCA protein quantitative analysis kit, high performance gel permeation chromatography (HPGPC), FT-IR, ion chromatograph and scanning electron microscope (SEM). The CCl₄-induced mouse model was used to detect the levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) in serum and hydroxyproline (Hyp) in liver tissue of mice after YJGP-W (50 mg/kg and 100 mg/kg) intervention for 3 weeks. Hematoxylin-eosin staining and sirius red staining were used to observe liver histological changes and to evaluate anti-liver fibrosis effect of YJGP-W. 16S rDNA sequencing technology was used to evaluate the effects of YJGP-W on gut microbiota in mice. And antibiotics combined with YJGP-W were used to evaluate whether YJGP-W exerted its medicinal effects by regulating gut microbiota. **Results** The total yield of YJGP-W was 11.60%, the total sugar content was 92.48%, and it was composed of at least two polysaccharides with molecular weights of 1.74×10^5 and 5.6×10^3 . Monosaccharide composition is composed of galactose, glucose, mannose, and fructose in molar ratios of 1.0 : 2.8 : 1.4 : 1.6. YJGP-W could ameliorate CCl₄-induced liver dysfunction, liver tissue pathological damage, collagen deposition and fibrosis after intervention for three weeks. YJGP-W induced structural changes of gut microbiota in mice while ameliorating liver fibrosis. At the phylum level, YJGP-W decreased the abundance of Bacteroidetes [(57.4±14.6)% vs (79.3±8.1)%, $P < 0.01$] and increased the abundances of Proteobacteria [(10.4±4.7)% vs (2.1±1.9)%, $P < 0.01$] and Actinobacteria [(3.7±2.4)% vs (0.3±0.1)%, $P < 0.01$]. At the genus level, YJGP-W increased the abundances of six bacterial genera, including *Parabacteroides*, *Escherichia-Shigella*, *Ruminococcus_gnavus_group*, *Sutterella*, *Lachnospiraceae_NK4A136_group* and *Fusobacterium* (LDA score > 3, $P < 0.01$), and decreased the abundances of four bacterial genera, including *Alloprevotella*, *Muribaculum*, *Prevotellaceae_UCG-001* and *Alistipes* (LDA score > 3, $P < 0.01$). After the intervention of antibiotics combined with YJGP-W, the anti-liver fibrosis activity of YJGP-W was weakened. **Conclusion** YJGP-W is an important material basis for anti-liver fibrosis effect of Yiguan Decoction, and the anti-liver fibrosis effect of YJGP-W may be related to its regulatory activity of gut microbiota.

Key words: Yiguan Decoction; polysaccharides; liver fibrosis; 16S rRNA gene sequencing; gut microbiota

肝纤维化是病毒性肝炎、非酒精性肝病、胆汁淤积性肝病等慢性肝病共有的病理变化，主要表现为肝组织内细胞外基质（extracellular matrix, ECM）过度增生与沉积，从而导致肝脏组织结构异常改变，并影响肝脏正常生理功能。由于肝纤维化病理机制复杂，目前尚无疗效明确的化学药物或生物学药物可供临床应用^[1-3]。一贯煎是现代临床治疗慢性肝病“肝肾阴虚”证的代表方剂，由清代名医魏之琇所创，由生地黄、北沙参、麦冬、当归、枸杞和川楝子组成。古籍中记载为“统治胁痛、吞酸、疝瘕，一切肝病”。近代名医张山雷称其为“涵养肝阴无上良方”。一贯煎作为治疗慢性肝病的代表名方，已有实验研究揭示了一贯煎治疗肝纤维化和肝硬化的部分作用机制，主要与抗氧化应激、提高肝细胞生物合成、抑制肝星状细胞活化、减轻胶原沉积、改善肝窦血管化、促进肝细胞再生等有关^[4-6]。近年来，越来越多研究发现包括肝纤维化在内的各种肝脏疾病的发生进展通常伴随着肠道菌群的失调，改善肠道菌群结构紊乱，可有效缓解肝脏疾病^[7-9]。一贯煎是

否可通过调节肠道菌群进而发挥改善肝纤维化的作用尚不清楚。现代化学成分研究表明一贯煎含有大量的多糖类成分，其含量高达 30%^[10]。目前，已有针对方中生地黄、北沙参、麦冬、当归和枸杞等单味药材多糖成分的功效研究^[11-17]，但针对全方多糖的研究尚未见报道。因此，本研究采用四氯化碳（carbon tetrachloride, CCl₄）诱导小鼠肝纤维化模型，考察一贯煎多糖组分对小鼠肝功能指标、纤维化相关指标和肝脏病理学改变等的影响，并基于肠道菌群分析，探讨一贯煎多糖发挥药效作用的途径，以期揭示一贯煎抗肝纤维化物质基础、指导临床应用与研究开发提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

6 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠（20~22 g），购自上海斯莱克实验动物有限公司，动物生产合格证号：SCXK（沪）2017-0005。动物饲养于上海中医药大学动物房，温度为（25±2）℃，相对湿度为（50±5）%，光照明、暗周期各 12 h。动物实验通

过上海中医药大学实验动物伦理委员会批准(PZSHUTCM201016007)。

1.2 药材

生地黄(产地河南温县,生产批号 YL-21-01-01)、枸杞子(产地宁夏中宁,生产批号 YL-21-01-07)、麦冬(产地浙江金华,生产批号 YL-21-01-09)、当归(产地甘肃岷县,生产批号 YL-21-01-06)、北沙参(产地内蒙赤峰,生产批号 YL-21-01-08)和川楝子(产地四川凉山,生产批号 YL-21-01-10)六味药材均由安徽致和堂药业有限公司提供,均经浙江中医药大学药学院吴建军副教授鉴定,分别为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的新鲜或干燥块根、茄科植物宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的干燥成熟果实、百合科植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (L.f) Ker-Gawl. 的干燥块根、伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根、伞形科植物珊瑚菜 *Glehnia littoralis* Fr. Schmidt ex Miq. 的干燥根和楝科植物川楝 *Melia toosendan* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果实。

1.3 药品与试剂

单糖标准品 *L*-岩藻糖(质量分数≥98%)、*L*-鼠李糖(质量分数≥98%)、*L*-阿拉伯糖(质量分数≥98%)、*D*-半乳糖(质量分数≥98%)、*D*-葡萄糖(质量分数 99.6%)、*D*-木糖(质量分数 99.9%)、*D*-甘露糖(质量分数≥98%)、*D*-果糖(质量分数≥99%)、*D*-核糖(质量分数≥98%)、*D*-半乳糖醛酸(质量分数≥98%)、*D*-葡萄糖醛酸(质量分数≥98%),均购自上海源叶生物科技有限公司;*L*-古罗糖醛酸(质量分数≥98%)、*D*-甘露糖醛酸(质量分数≥98%)均购自青岛博智汇力生物科技有限公司。3500 Da 透析袋购自上海源叶生物公司;DEAE Sephrose Fast Flow 弱阴离子交换树脂购自瑞典 GE Healthcare 公司;CCl₄、橄榄油、羧甲基纤维素钠、氯化钠、氢氧化钠、乙醇、硫酸、苯酚等试剂均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司;苏木素-伊红(HE)染色试剂盒,羟脯氨酸试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20200716、A030-1);PCR 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成,引物序列见表 1。

1.4 主要仪器

Dionex ICS5000 型离子色谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),1100 型液相色谱仪(美国 Agilent Technologies 公司),LC-10N-50A 型冷冻干燥机(LICHEN 公司),UV-3600 型紫外可见近红外

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequences

基因名称	引物序列 (5'-3')
<i>GAPDH</i>	上游: CATCACTGCCACCCAGAAGACTG 下游: ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG
<i>α-SMA</i>	上游: ACCATCGGCAATGAGCGTTTCC 下游: GCTGTTGTAGGTGGTCTCATGG
<i>Col-I</i>	上游: CCTCAGGGTATTGCTGGACAAC 下游: CAGAAGGACCTTGTTTGCCAGG

光谱仪(日本 SHIMADZU 公司),2000 傅里叶红外仪(美国 PerkinElmer 公司),SU8100 型场发射扫描电子显微镜(日本 HITACHI 公司),MC1000 型离子溅射仪(日本 HITACHI 公司)。

2 方法

2.1 一贯煎多糖功效组分的制备

一贯煎出自清代钱敏捷的《医方聚度》,《古代经典名方关键信息表(7 首方剂)》明确一贯煎处方剂量为北沙参、麦冬、当归各 5.60 g,生地黄、枸杞子各 11.19 g,川楝子 7.46 g,制法为水煎服。根据《按古代经典名方目录管理的中药复方制剂药学研究技术指导原则(试行)》规定“水煎服”应参照《医疗机构中药煎药室管理规范》,即待煎药物应当先行浸泡,浸泡时间一般不少于 30 min,加水量应没过药材 2~5 cm 为宜,滋补药物先用武火煮沸后,改用文火慢煎约 40~60 min,每剂药一般煎煮 2 次。本研究根据上述规定进行一贯煎制样,合并 2 次水煎液,减压浓缩后加 95%乙醇至乙醇体积分数为 70%,室温静置过夜后,4 000×g 离心 20 min,弃去上清液,收集沉淀,沉淀用无水乙醇洗涤 2 次,待室温挥干至无醇味,用少量纯水溶解,冷冻干燥,得一贯煎粗多糖 YGJP。取约 5 g 的 YGJP 溶解于 15 mL 的蒸馏水,8 000×g 离心 10 min 后吸取上清液进行上样弱阴离子交换树脂柱(DEAE Sepharose Fast Flow, 500 mm×55 mm),依次用蒸馏水及 0.2、0.5 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱,分别收集洗脱液,使用苯酚-硫酸法跟踪监测洗脱峰。按照洗脱峰收集各洗脱部位,减压浓缩,透析 48 h,冷冻干燥,即得到各一贯煎多糖组分 YGJP-W、YGJP-0.2 和 YGJP-0.5^[18-19]。

2.2 一贯煎多糖组分的化学表征

2.2.1 总糖、糖醛酸及蛋白含量测定 采用苯酚-硫酸法测定一贯煎多糖样品的总糖含量。精密称取葡萄糖标准品 5.00 mg,用蒸馏水定容于 50 mL 量瓶中,得质量浓度 100.0 μg/mL 的葡萄糖母液。分

别精密量取 0、0.4、0.8、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 mL 的葡萄糖母液于 20 mL 具塞试管中,各以蒸馏水补至 2.0 mL,配成系列质量浓度为 0、20、40、60、70、80、90、100 $\mu\text{g/mL}$ 的葡萄糖对照品溶液,然后加入 1.0 mL 的 6% 苯酚及 5.0 mL 浓硫酸,摇匀,室温反应 20 min 以后于 490 nm 测定吸光度 (A)。以对照品质量浓度为横坐标 (X),以 A 值为纵坐标 (Y),得标准曲线。取 3 份一贯煎多糖样品各 5 mg,用蒸馏水定容于 50 mL 量瓶中,按照标准品同法操作,根据标准曲线计算一贯煎多糖样品的总糖含量。

采用间羟基联苯法测定一贯煎多糖样品的糖醛酸含量。精密称取半乳糖醛酸标准品约为 10.00 mg,用蒸馏水定容于 10 mL 量瓶中,得质量浓度约为 1.0 mg/mL 的半乳糖醛酸溶液,精密量取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 的半乳糖醛酸母液于 10 mL 量瓶中,加蒸馏水定容,配成系列质量浓度约为 0、20、40、60、80、100 $\mu\text{g/mL}$ 的半乳糖醛酸对照溶液。依次吸取半乳糖醛酸对照溶液 0.5 mL 于 20 mL 具塞试管中,冰浴冷却后加入 3.0 mL 四硼酸钠-硫酸溶液,混匀,在沸水浴中加热 5 min;以冰浴冷却至室温后,加入 50 μL 的 0.15% 间羟基联苯溶液,摇匀后,使用紫外分光光度计在 520 nm 处测定其 A 值。以对照品质量浓度为横坐标 (X),以 A 值为纵坐标 (Y),得标准曲线。取 3 份一贯煎多糖样品各 5.00 mg,用蒸馏水定容于 50 mL 量瓶中,取溶液各 0.5 mL (每份相当于 50 μg 多糖样品) 于 20 mL 具塞试管中,按照标准品同法操作,根据标准曲线计算一贯煎多糖样品的糖醛酸含量。

使用 BCA 蛋白定量分析试剂盒测定,按照试剂盒说明配制工作液,并配制 1 mg/mL 的样品溶液。根据微孔板方案 (样品与工作液的比例为 1:8),取 3 份一贯煎多糖样品按照标准曲线同法操作,根据标准曲线计算一贯煎多糖样品的蛋白含量。

2.2.2 紫外光谱扫描分析 将一贯煎多糖样品用纯水溶解后配制成质量浓度为 1 mg/mL 的溶液,用紫外-可见分光光度计在 200~400 nm 进行扫描。

2.2.3 相对分子质量测定 采用高效凝胶渗透色谱法 (high performance gel permeation chromatography, HPGPC) 对一贯煎多糖组分进行相对分子质量测定。分别取相对分子质量已知的 Dextran P-系列标准葡聚糖 P-5 (6 100)、P-10 (9 600)、P-20 (21 100)、P-50 (47 100)、P-100 (10 700)、P-200 (19 400)、P-400 (33 700) 和 P-800 (64 200) 各 2 mg,加入

1 mL 的流动相,即 0.22 μm 水相滤膜滤过后的 0.2 mol/L 的 NaCl 溶液,以 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液置于液相小瓶,即得质量浓度为 2 mg/mL 的系列标准品溶液;同法制得 2 mg/mL 的一贯煎多糖样品溶液,进行 HPGPC 分析,色谱条件如下:色谱系统为 Agilent1100,色谱柱为 Shodex SUGAR KS-804 (300 mm $\times$ 8 mm) 和 KS-802 (300 mm $\times$ 8 mm) 串联;流动相为 0.2 mol/L 的 NaCl 溶液,柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$,体积流量为 0.8 mL/min,进样体积为 20 μL ,检测器为示差检测器。标准曲线的绘制处理及相对分子质量计算由 GPC 软件自动完成,根据测定样品的保留时间,可从标准曲线中求得一贯煎多糖的相对分子质量分布。

2.2.4 FT-IR 分析 取约 2 mg 的一贯煎多糖样品与 100 mg 的干燥 KBr 混合,研细后压片,在 400~4 000 cm^{-1} 进行红外扫描,对扫描图的吸收峰进行解析。

2.2.5 单糖组成分析 采用高效离子交换色谱仪 (high-performance ion exchange chromatogram, HPIEC) 测定单糖组成。精密称取 13 个单糖对照品 (岩藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖、果糖、核糖、半乳糖醛酸、古罗糖醛酸、葡萄糖醛酸、甘露糖醛酸) 约 3 mg,用去离子水配制成 30 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照溶液。精密称取 YGJP-W 样品约 5 mg 置于安瓿瓶中,加入 2 mol/L 三氟乙酸 (TFA) 溶液 2 mL,在 121 $^{\circ}\text{C}$ 加热 2 h,准确吸取酸水解溶液转移至管中氮吹吹干。加入甲醇清洗,再吹干,重复甲醇清洗 2~3 次。加入去离子水涡旋混匀,吸取 200 μL 加入 800 μL 去离子水,在 12 000 r/min 离心 5 min,转入色谱瓶中待测。色谱系统采用 Thermo ICS 5000⁺ 离子色谱系统 (Thermo Fisher Scientific, 美国),色谱柱为 Dionex CarbpacTM PA20 (150 mm $\times$ 3 mm, 10 μm),流动相 A 为 H_2O , B 为 0.1 mol/L NaOH 水溶液, C 为 0.1 mol/L NaOH、0.2 mol/L NaAc,梯度洗脱 (0~26.0 min, 95% A、5% B; 26.0~26.1 min, 95%~85% A、5% B、0~5% C; 26.1~42.0 min, 85% A、5% B、10% C; 42.0~42.1 min, 85%~60% A、5%~0 B、10%~40% C; 42.1~52.0 min, 60% A、0~40% B、40%~0 C; 52.0~52.1 min, 60%~95% A、40%~5% B; 52.1~60.0 min, 95% A、5% B); 体积流量为 0.5 mL/min,进样量为 5 μL ;柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$;检测器为电化学检测器。根据绝对定量方法,测定不同单糖质量,根据单糖摩尔质量计算出各单糖的物质的量比^[20-21]。

2.2.6 SEM 分析 取约 5mg 的干燥后的一贯煎多糖粉末样品,粘附于含有双面粘合剂的导电碳膜上,置于离子溅射仪的样品舱中,进行喷金 40 s 左右。接着将样品取出,置入扫描电镜观察室,在 2.0 kV 加速电压下使用扫描电子显微镜,进行观察。

2.3 YGJP-W 对 CCl₄ 诱导小鼠肝纤维化的干预作用

2.3.1 动物分组 取 35 只雄性 C57 小鼠,随机平均分为 5 组,分别为对照组、模型组、阳性药组和不同剂量 YGJP-W 给药组。

2.3.2 造模与给药 按 2 mL/kg ip 15% CCl₄-橄榄油,1 周注射 3 次(周一、周三与周五),共造模 6 周,每周记录 1 次动物体质量。自造模第 4 周第 1 天起,YGJP-W 低、高剂量组分别按 50、100 mg/kg 体质量的剂量 ig 0.3% CMC-Na 溶液配制的 YGJP-W 溶液,阳性药组按 10 mg/kg ig 0.3% CMC-Na 溶液配制的索拉菲尼,对照组和模型组 ig 同体积 0.3% CMC-Na 溶液,每日 ig 1 次。

2.3.3 动物处理取材方法 各组小鼠在造模的第 6 周末最后 1 次给药后禁食 12 h。各组小鼠称定质量后用 3%戊巴比妥钠,按照 0.1 mL/10 g 体质量注射进行麻醉。待麻醉成功后,腹主动脉取血,全血放置 4 °C 静置后在 4 000 r/min 离心 15 min,取上清放置 -80 °C 冰箱备用。而后摘取小鼠肝脏和脾脏,用滤纸吸取血液后拍照、称定质量并记录。收集肠道内容物,用于 16S RNA 检测。然后取小鼠肝大叶同一部位切取约 1 cm×1 cm 大小肝组织放入 10%中性甲醛缓冲液固定,以制作病理切片。

2.3.4 血清谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)和谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)检测 全自动化分析法检测血清肝功能将血清样本室温解冻,振荡混匀,按标号的顺序依次放入曙光医院检验科全自动化分析仪中,分析仪检测试剂瓶中加入相应的 ALT 和 AST 试剂,按照试剂盒说明书步骤检测 ALT 和 AST 活性。

2.3.5 HE 染色和天狼猩红染色观察肝脏组织学变化 取小鼠肝大叶同一部位肝组织,置于 10%中性甲醛缓冲液固定,自动脱水机脱水,石蜡包埋,切片。HE 和天狼猩红染色,将封好的片子用数据扫描切片仪自动扫描,观察肝细胞损伤、炎症浸润、胆管反应、胶原纤维增生与沉积程度。并采用图像分析软件 Leica LAS Image Analysis 对天狼猩红染色阳性面积进行定量分析。

阳性染色面积百分比=阳性染色面积/图片总面积

2.3.6 碱水解法检测肝组织羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)含量 使用碱水解法对肝组织中的 HYP 含量进行检测,称取肝组织 50 mg,水解,调 pH 6.0~6.8,检测步骤按照试剂盒说明书操作进行。

2.3.7 小鼠肠道微生物分析 取收集到的对照组、模型组和 YGJP-W 高剂量组的小鼠粪便,采用 MagPure Soil DNA LQ Kit (Magan) 试剂盒提取粪便总 DNA,利用 NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, 美国)和琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的浓度和纯度。采用引物 343F (5'-TACGGRAGGCA-GCAG-3') 和 798R (5'-AGGGTATCTAATCCT-3') 扩增 16S rRNA 基因的 V3-V4 可变区。PCR 扩增产物使用琼脂糖凝胶电泳检测。使用 Illumina NovaSeq 6000 测序平台进行测序。测序由上海殷易生物技术有限公司完成。测序数据进行预处理生成优质序列之后,采用 Vsearch 软件,根据序列的相似性,将序列归为多个 OTU。序列相似度大于或等于 97% 被归为 1 个 OTU 单元,挑选出各个 OTU 的代表序列,使用 Silva (version138) 数据进行比对注释,进行分析。

2.4 YGJP-W 对菌群耗竭后 CCl₄ 诱导小鼠肝纤维化的干预作用研究

2.4.1 抗生素溶液(ABX)制备: 称取 1 g 甲硝唑、1 g 青霉素 G 钾、1 g 硫酸新霉素和 0.5 g 盐酸万古霉素,倒入 1.5 L 干净的塑料瓶中,加入 1 L 的蒸馏水,涡旋混匀,即得抗生素溶液^[22]。

2.4.2 动物分组 取 42 只雄性 C57 小鼠,随机平均分为 6 组,分别为对照组、模型组(CCl₄)、YGJP-W 组(CCl₄+YGJP-W)、对照加抗生素组(ABX)、模型加抗生素组(CCl₄+ABX)和 YGJP-W 加抗生素组(CCl₄+YGJP-W+ABX)。

2.4.3 造模与给药 模型组按 2 mL/kg ip 15% CCl₄-橄榄油,每周注射 3 次(周一、周三与周五),共造模 6 周,对照组和对照加抗生素组按 2 mL/kg ip 空白橄榄油,每周记录 1 次动物体质量。自造模第 4 周第 1 天起,YGJP-W 组和 YGJP-W 加抗生素组均按 100 mg/kg ig 0.3% CMC-Na 溶液配制的 YGJP-W 溶液,其他组 ig 同体积 0.3% CMC-Na 溶液,每日 ig 1 次。加抗生素组小鼠饮用水换为抗生素溶液,其他组自由饮用正常水。

2.4.4 动物处理取材与指标检测 本实验动物处理取材同“2.3.3”项,血清 ALT 和 AST、肝组织

HE 染色、天狼猩红染色与 HYP 含量检测同“2.3.4”~“2.3.6”项。

2.4.5 血清总胆红素、间接胆红素、直接胆红素和总胆酸检测 将血清样本室温解冻，振荡混匀，按标号的顺序依次放入曙光医院检验科全自动化分析仪中；分析仪检测试剂瓶中加入相应的血清总胆红素（total bilirubin, TBIL）、间接胆红素（indirect bilirubin, IBIL）、直接胆红素（direct bilirubin, DBIL）和总胆酸（total bile acid, TBA）试剂，按照试剂盒说明书步骤检测 TBIL、IBIL、DBIL 和 TBA 活性。

2.4.6 实时荧光定量聚合酶链式反应（Real-time PCR） 称取肝组织 50 mg，加 trizol 1 mL 提取总 RNA，具体操作步骤按说明书进行，应用 NanoVue 浓度检测仪，检测 RNA 浓度及 RNA 纯度（ $A_{260/280}$ 和 $A_{260/230}$ ）。使用逆转录试剂盒对总 RNA 进行逆转录，反应条件为 35 °C 反应 10 min，55 °C 逆转录 20 min，85 °C 变性 5 min，即得 cDNA。取 384 孔 PCR 板加样，Real-time PCR 法检测对应指标，采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各 mRNA 表达量。

2.5 统计学分析

采用 SPSS20.0 软件对数据进行统计学分析，计量资料采用非参数检验，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间多重比较分析采用 One-way ANOVA 结合 LSD 多重比较分析，以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 一贯煎多糖组分的化学表征

3.1.1 制备及总糖、糖醛酸和蛋白含量测定 根据一贯煎组方，取北沙参、麦冬、当归各 56.0 g，枸杞子、生地各 111.9 g，川楝子（敲碎）74.6 g，通过 2 次煎煮后醇沉制备得到一贯煎粗多糖（YGJP）93.2 g，得率为 19.98%。取 5.20 g 的 YGJP 经弱阴离子交换树脂（DEAE Sepharose Fast Flow, 500 mm × 55 mm）分别以蒸馏水、0.2 和 0.5 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱，洗脱曲线见图 1。依次得到 3 个部位：YGJP-W（3.02 g）、YGJP-0.2（0.23 g）和 YGJP-0.5（0.09 g），得率分别为 58.08%、4.42%、1.73%。结果显示 YGJP-W 是 YGJP 的主要部位，从一贯煎整方药材制备得到 YGJP-W 的总得率为 11.60%。采用苯酚-硫酸法测定总糖含量，标准曲线的回归方程为 $Y = 5.628X + 0.0716$ ， $R^2 = 0.9967$ ，计算数据显示 YGJP-W 的总糖质量分数为 $(92.48 \pm 2.75)\%$ 。采用间羟基联苯法测定糖醛酸质量分数，标准曲线的回归方程为 $Y = 7.221X + 0.0373$ ， $R^2 = 0.9978$ ，计

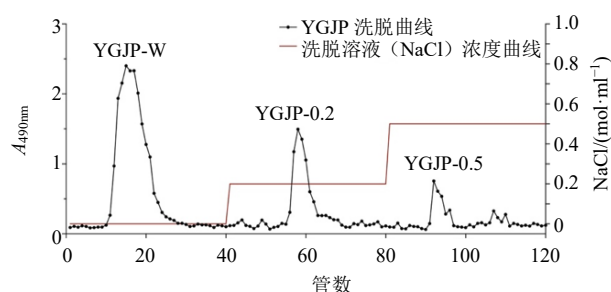


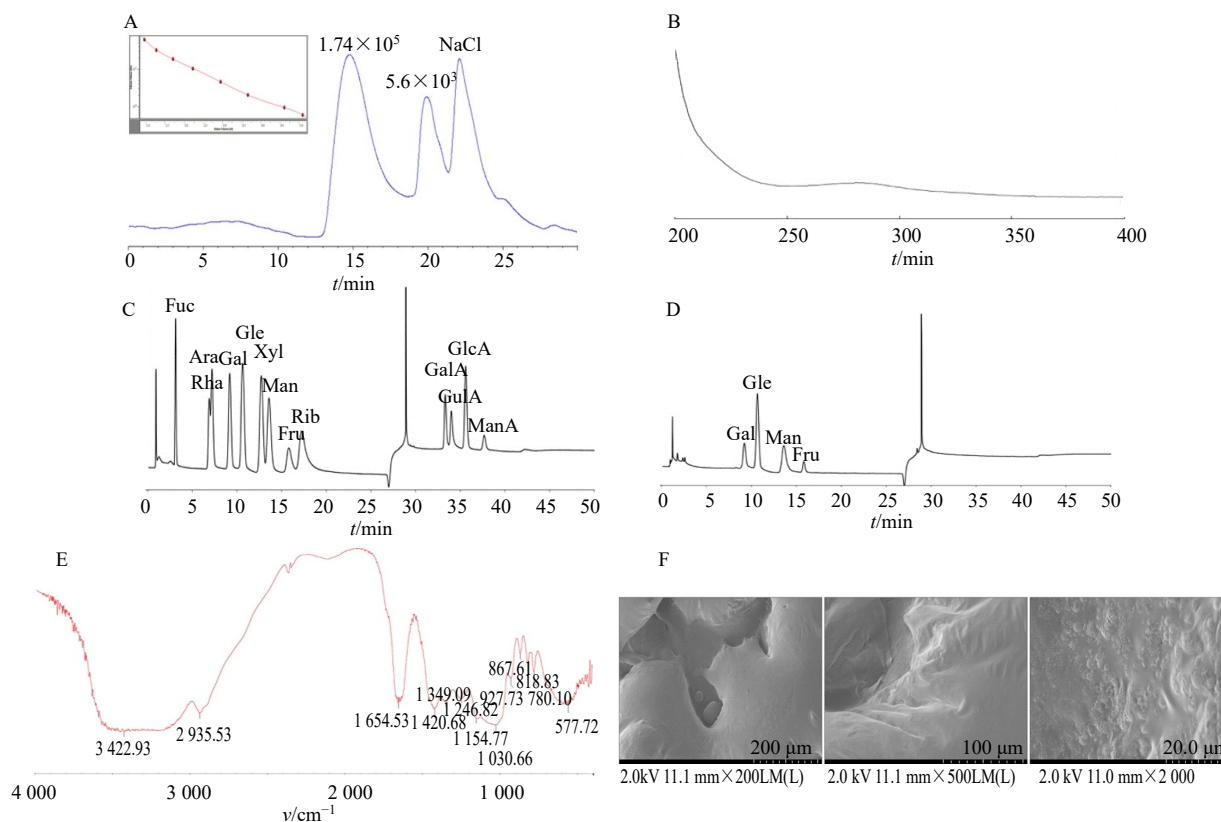
图 1 YGJP 经 DEAE 琼脂糖离子交换色谱柱的洗脱曲线
Fig. 1 Elution curve of YGJP on a DEAE agarose ion exchange chromatographic column

算数据显示 YGJP-W 的糖醛酸质量分数为 $(1.87 \pm 0.14)\%$ 。采用 BCA 蛋白定量分析测定蛋白含量，标准曲线的回归方程为 $Y = 0.831X + 0.154$ ， $R^2 = 0.9984$ ，计算数据显示 YGJP-W 的蛋白含量为 $(4.39 \pm 1.65)\%$ 。分析结果说明 YGJP-W 主要是中性糖类成分，含有极少量蛋白，几乎不含糖醛酸类成分。

3.1.2 相对分子质量分布测定 采用 HPGPC 对 YGJP-W 的相对分子质量分布进行测定。如图 2-A 所示，YGJP-W 的 HPGPC 谱图除 NaCl 溶剂峰外，分别在 14.9、19.7 min 处表现出 2 个主要峰，表明 YGJP-W 存在非均一性。根据标准曲线和 HPGPC 软件计算，结果显示 2 个主要峰的平均相对分子质量分别为 1.74×10^5 和 5.6×10^3 ，而 1.74×10^5 和 5.6×10^3 的峰含有 1 个明显的肩峰，是由于存在 2 种相对分子质量接近的多糖导致，HPGPC 结果说明 YGJP-W 至少是由 2 种不同相对分子质量的多糖组成的精多糖。

3.1.3 紫外光谱扫描分析 如图 2-B 所示，YGJP-W 在 260 nm 处无明显的吸收峰，说明其不含核酸类物质，在 280 nm 处表现微弱的吸收峰，说明其含有极少量的蛋白类物质，跟 BCA 蛋白定量分析结果一致。

3.1.4 FT-IR 分析 YGJP-W 的 FT-IR 图谱表现出典型的多糖特征吸收峰（图 2-E）。3 422、2 935、1 420 cm^{-1} 的 3 个强吸收峰分别来自 O-H、C-H 及环外 C-O 的伸缩振动，1 654 cm^{-1} 的强吸收峰来自羟基 O-H 的弯曲振动，而 1 349 cm^{-1} 的吸收峰来自 C-O 的弯曲振动，1 250~1 000 cm^{-1} 的峰来源于糖环内 C-O 的伸缩振动，吡喃糖在此范围内表现为 3 个吸收峰。YGJP-W 在此范围内表现出 3 个吸收峰（1 030、1 154 和 1 246 cm^{-1} ），表明吡喃糖的存在。927 和 818 cm^{-1} 的吸收峰表明存在 β -D 型果糖呋喃糖。YGJP-W 图谱在 1 740 cm^{-1} 附近没有峰，说明 YGJP-W 不含有



A: YGJP-W 的高效凝胶渗透色谱图; B: YGJP-W 的紫外光谱图; C: 对照单糖的高效离子交换色谱图; D: 完全水解后 YGJP-W 的高效离子交换色谱图; E: YGJP-W 的红外光谱图; F: YGJP-W 的扫描电镜图 ($\times 200$ 、 $\times 500$ 、 $\times 2\,000$)。

A: HPGPC of YGJP-W; B: Ultraviolet spectrum of YGJP-W; C: HPIEC of monosaccharide standards; D: HPIEC of YGJP-W after complete hydrolysis; E: FT-IR spectrum of YGJP-W; F: SEM images of YGJP-W ($\times 200$, $\times 500$, $\times 2\,000$).

图 2 YGJP-W 的基本结构特征

Fig. 2 Basic structural characteristics of YGJP-W

-COOH 官能团, 即不含有糖醛酸, 为中性多糖, 跟糖醛酸检测结果一致。

3.1.5 单糖组成分析 13 个单糖对照品的离子色谱图显示出 13 个峰 (图 2-C), 由于各单糖在离子色谱的响应度不同, 导致其 13 个单糖对照品的峰面积各异, YGJP-W 完全酸水解后的离子色谱图显示出 4 个峰 (图 2-D), 通过对照品比较可知为半乳糖、葡萄糖、甘露糖和果糖, 物质的量比为 1.0 : 2.8 : 1.4 : 1.6。单糖分析结果再次证明 YGJP-W 不含有糖醛酸类, 为中性多糖。

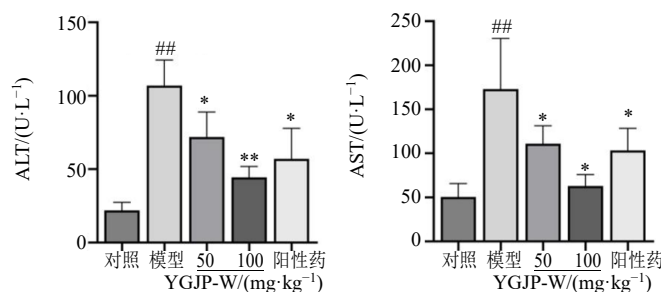
3.1.6 SEM 分析 200 倍电镜下 (图 2-F), YGJP-W 呈不规则的致密结构, 表面较为光滑, 结构较为完整; 在 500 倍镜下, YGJP-W 致密结构被放大, 表面凹凸不平, 呈褶皱状; 在 2 000 倍镜下, 样品表面可见不规则凸起结构, 可能是由于多糖样品分子间相互作用较强, 导致聚合紧密。

3.2 YGJP-W 对 CCl₄ 诱导小鼠肝纤维化的干预作用

3.2.1 对血清肝功能的影响 血清生化结果见图 3,

与对照组比较, 模型组小鼠血清 ALT、AST 显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, YGJP-W 各给药组与阳性组血清 ALT 和 AST 均有不同程度降低, 其中 YGJP-W 低剂量组和阳性药物组血清 ALT 和 AST 下降明显 ($P < 0.05$), YGJP-W 高剂量组血清 ALT ($P < 0.01$) 和 AST 同样下降明显 ($P < 0.05$)。

3.2.2 对 CCl₄ 肝纤维化小鼠肝组织病理学及 HYP 质量分数的影响 肝组织病理染色结果见图 4。HE 染色结果显示, 对照组肝脏肝小叶结构清晰, 无炎性细胞浸润; 模型组小鼠肝小叶结构严重破坏, 可见存在大量的炎性细胞浸润及组织坏死; YGJP-W 各给药组与阳性组炎性细胞浸润及组织坏死较模型组均有不同程度改善, 其中以 YGJP-W 高剂量组改善效果最为显著。SR 染色结果显示, 对照组小鼠肝组织仅在汇管区可见少量胶原纤维沉积; 模型组小鼠肝组织出现大量胶原沉积, 以汇管区为中心向四周呈发散状分布; 与模型组相比, YGJP-W 各给药组与阳性组内胶原沉积均有不同程度地减少, 其中



与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 图 5 同。

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as Fig 5.

图 3 YGJP-W 对 CCl₄ 诱导肝纤维化小鼠血清生化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Fig. 3 Effects of YGJP-W on serum biochemistry in CCl₄-induced liver fibrosis mice ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

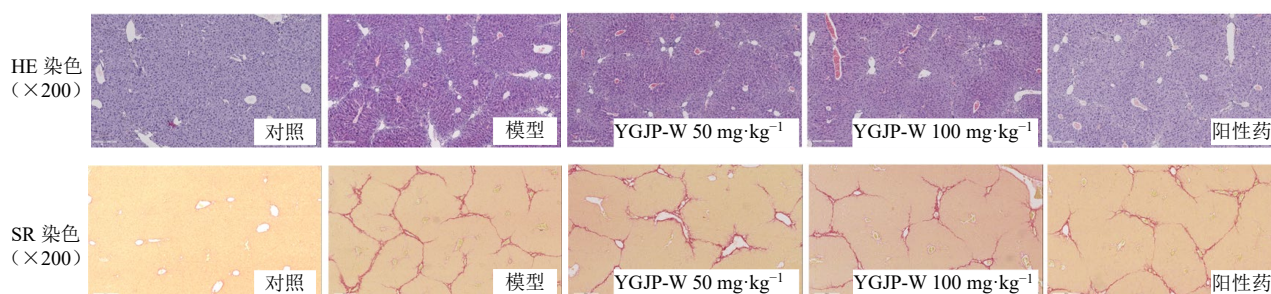


图 4 小鼠肝组织病理 HE 和 SR 染色

Fig. 4 HE and SR staining of liver tissue in mice

以 YGJP-W 高剂量组的效果最为显著。HYP 和 SR 半定量结果见图 5, 与对照组相比, 模型组肝组织内 HYP 质量分数显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组相比, YGJP-W 各给药组与阳性组 HYP 质量分数显著下降 ($P < 0.05$)。天狼星红染色胶原半定量结果显示, 与对照组相比, 模型组小鼠肝组织胶原面积显著增加 ($P < 0.01$); YGJP-W 高剂量组与阳性组胶原面积较模型组显著下降 ($P < 0.05$)。

3.2.3 对 CCl₄ 肝纤维化小鼠肠道菌群的影响 采用主成分分析 (principal component analysis, PCA) 比较对照组, 模型组和 YGJP-W 高剂量组之间的肠道菌群组成差异, 通过提取 3 组中各样本的 16s

rDNA 序列的主成分因子, 得到 PCA 图 (图 6-A) 可知, 对照组和模型组基本可以分开, 说明 CCl₄ 干预能够对小鼠肠道菌群结构产生明显影响, 而模型组和 YGJP-W 组也基本可以分开, 说明 YGJP-W 能够引起小鼠肠道菌群结构发生变化。

接着, 为了进一步解释 YGJP-W 对小鼠肠道菌群结构产生何种具体影响, 分别在门级别和种级别评估 YGJP-W 干预后的肠道菌群的整体结构。在门水平上 (图 6-B~F), 拟杆菌门 (57.3 ± 13.8 %) 是对照组的优势细菌门, 其次是厚壁菌门 (29.4 ± 8.4 %)、变形菌门 (5.0 ± 3.3 %) 和放线菌门 (3.6 ± 2.1 %)。CCl₄ 诱导能够显著增加了拟杆菌门的丰度

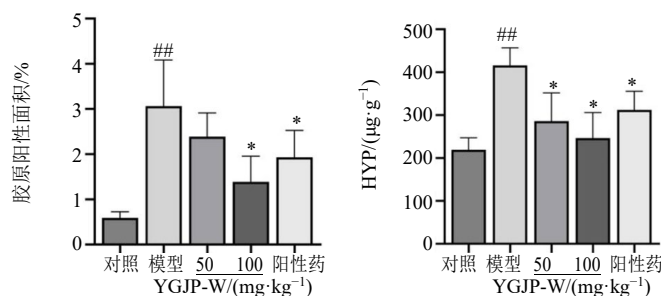
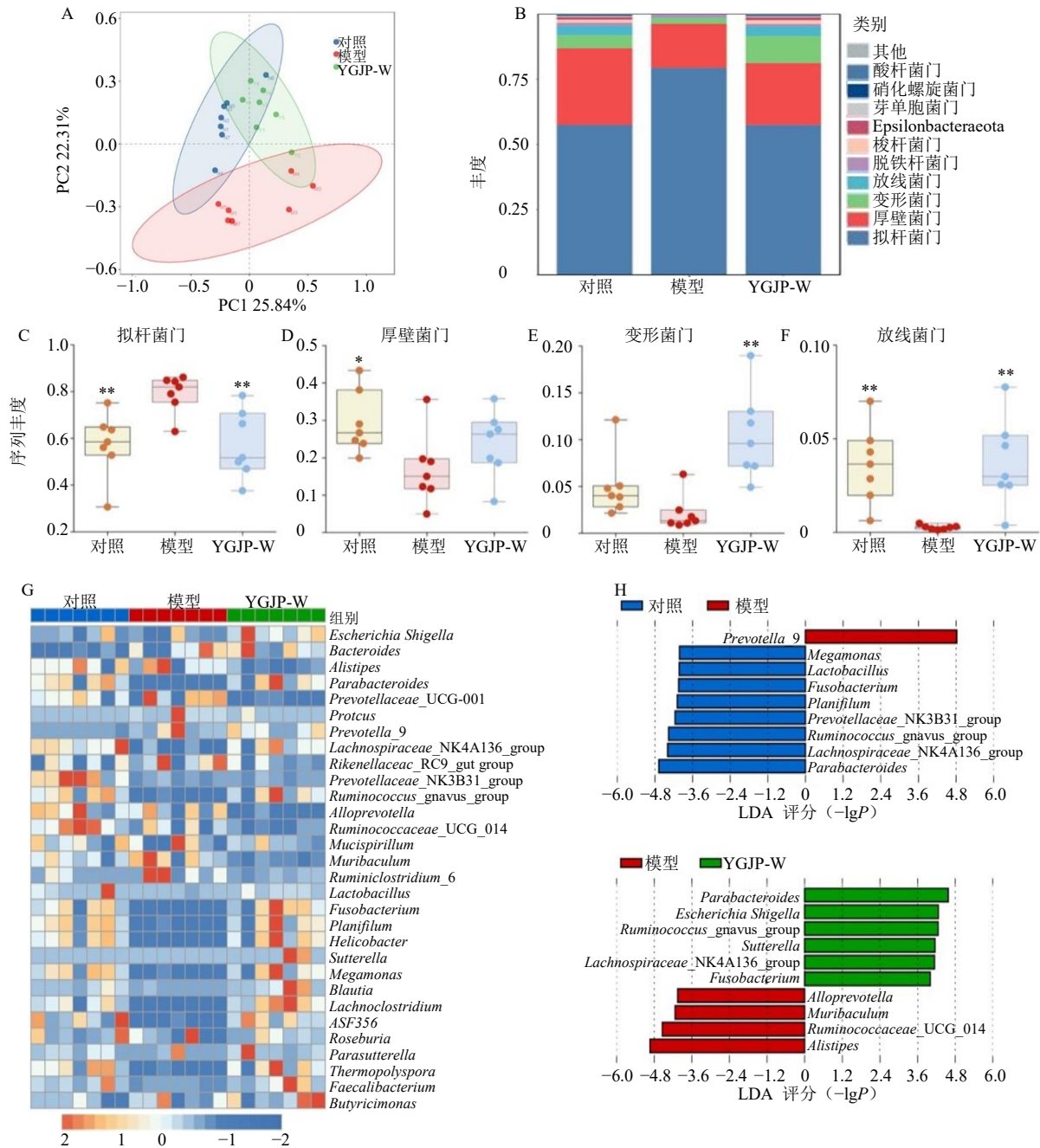


图 5 小鼠肝组织 HYP 含量和 SR 阳性面积 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Fig. 5 HYP content and SR positive area of liver tissue in mice ($\bar{x} \pm s, n = 7$)



A: 对照组、模型组和 YGJP-W 组的 PCA; B: 3 组的群落丰度在门水平上的平均百分比; C~F: 三组的肠道菌群中拟杆菌门 (C)、厚壁菌门 (D)、变形菌门 (E) 和放线菌门 (F) 的相对丰度; G: 3 组每个样品在属水平上的微生物分布热图, 红色和蓝色方块分别表示各属 OTU 高水平 and 低水平的 z 得分值; H: 对照组和模型组 (上) 及模型组和 YGJP-W 组 (下) 样本肠道菌属 LEfSe 分析; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

A: PCA of control, model and YGJP-W groups B: Average percentage of community abundance on phylum-level in three groups C~F: Relative abundances of (C) Bacteroidetes, (D) Firmicutes, (E) Proteobacteria and (F) Actinobacteria in gut microbiota in three groups G: Heatmap of microbial distributions at genus level for each sample in three groups. Blocks in red and blue denote high and low z-score values of OTU sizes, respectively H: LEfSe analysis of gut microbiota in control and model groups (top) and model and YGJP-W groups (bottom); * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group.

图 6 YGJP-W 对 CCl₄ 诱导小鼠肠道菌群的作用

Fig. 6 Effects of YGJP-W on gut microbiota in CCl₄-induced mice

[$(79.3 \pm 8.1) \%$, $P < 0.01$], 减少了厚壁菌门 [$(16.9 \pm 9.6) \%$, $P < 0.05$] 和放线菌门 [$(0.3 \pm 0.1) \%$, $P < 0.01$] 的丰度, 同时也减少了变形菌门 [$(2.1 \pm$

$1.9) \%$, $P > 0.05$] 的丰度, 但不具有显著性差异。YGJP-W 干预后, 拟杆菌门 ($57.4 \pm 14.6) \%$, 丰度显著性降低 ($P < 0.01$), 几乎回调到对照组水平,

变形菌门 (10.4 ± 4.7) % 和放线菌门 (3.7 ± 2.4) % 丰度均显著性升高 ($P < 0.01$), 提示 YGJP-W 逆转了 CCl_4 导致的菌群变化。

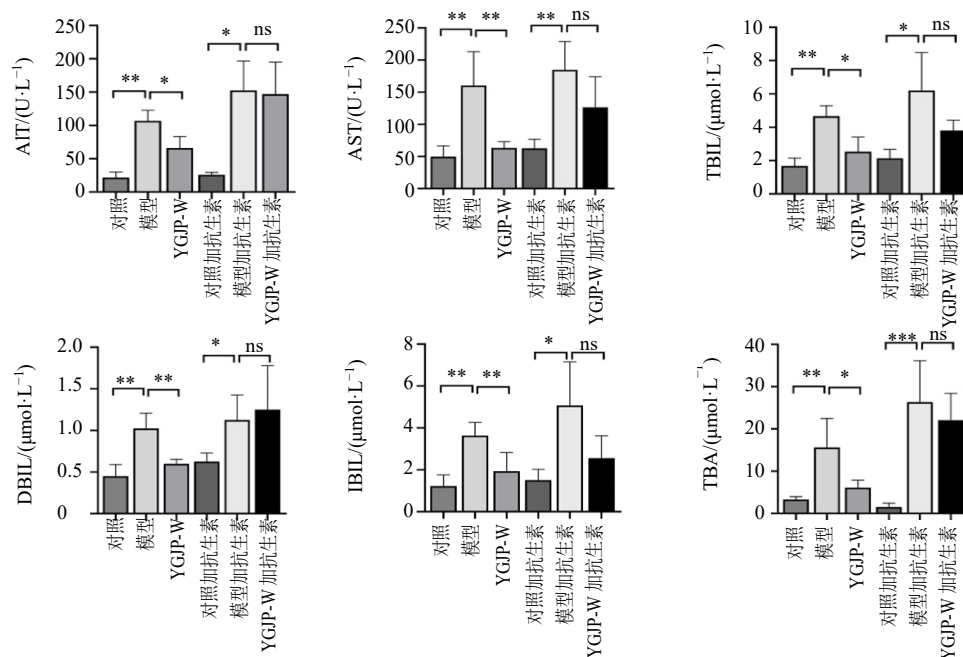
在属水平上, 对丰度前 30 的细菌进行了分析 (图 6-G), 线性判别分析 (linear discriminant analysis effect size, LEfSe) 结果显示 (图 6-H), 以 $\lg \text{LDA} > 3.0$ 为阈值, 与对照组相比, CCl_4 诱导显著影响了 9 个细菌属的丰度 ($\text{LDA score} > 3.0$, $P < 0.05$), 其中 8 个属, 包括狄氏副拟杆菌属 *Parabacteroides*、毛螺菌属 NK4A136 组 *Lachnospiraceae_NK4A136_group*、活泼瘤胃球菌属 *Ruminococcus_gnavus_group*、普雷沃氏菌科 NK3B31 组 (*Prevotellaceae_NK3B31_group*)、扁平丝菌属 *Planifilum*、梭杆菌属 *Fusobacterium*、乳杆菌属 *Lactobacillus* 和巨单胞菌属 *Megamonas* 的丰度降低, 1 个菌属, 普雷沃氏菌 (*Prevotella_9*) 的丰度增加。YGJP-W 的干预影响了 10 个细菌属的丰度 ($\text{LDA score} > 3.0$, $P < 0.05$), 其中 6 个细菌属, 包括狄氏副拟杆菌属、埃希氏菌-志贺氏菌属 *Escherichia-Shigella*、活泼瘤胃球菌属、萨特氏菌属 *Sutterella*、毛螺菌属 NK4A136 组和梭杆菌属的丰度增加, 4 个细菌属包括拟普雷沃氏菌属 *Alloprevotella*、肠鼠杆菌属 *Muribaculum*、普雷沃氏

菌属 UCG-001 *Prevotellaceae_UCG-001* 和另枝杆菌 *Alistipes* 的丰度降低。

3.3 YGJP-W 对菌群耗竭后 CCl_4 诱导小鼠肝纤维化的干预作用

3.3.1 对血清肝功能的影响 血清生化结果见图 7。与对照组比较, 模型组小鼠血清 ALT、AST、TBIL、DBIL、IBIL 和 TBA 显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组比较, YGJP-W 组血清 ALT、AST、TBIL、DBIL、IBIL 和 TBA 均有不同程度降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。抗生素耗竭后, 与对照加抗生素组相比, 模型加抗生素组血清 ALT、AST、TBIL、DBIL、IBIL 和 TBA 显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.001); 然而, 与模型加抗生素组相比, YGJP-W 加抗生素组不能显著降低血清 ALT、AST、TBIL、DBIL、IBIL 和 TBA。结果提示 YGJP-W 改善血清肝肝功能为菌群依赖性。

3.3.2 对 CCl_4 肝纤维化小鼠肝组织病理学及 HYP 含量的影响 肝组织病理染色结果见图 8。HE 染色结果显示, 对照组肝脏肝小叶结构清晰, 无炎性细胞浸润; 模型组小鼠肝小叶结构严重破坏, 可见存在大量的炎性细胞浸润及组织坏死; YGJP-W 组炎性细胞浸润及组织坏死较模型组改善效果显著。SR



两组间比较: ns $P > 0.05$, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 图 9、10 同。
ns $P > 0.05$, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ between two groups, same as Figs. 9 and 10.

图 7 YGJP-W 对菌群耗竭后 CCl_4 诱导肝纤维化小鼠血清生化的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

Fig. 7. Effects of YGJP-W on serum biochemistry in CCl_4 -induced liver fibrosis mice after bacterial depletion ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

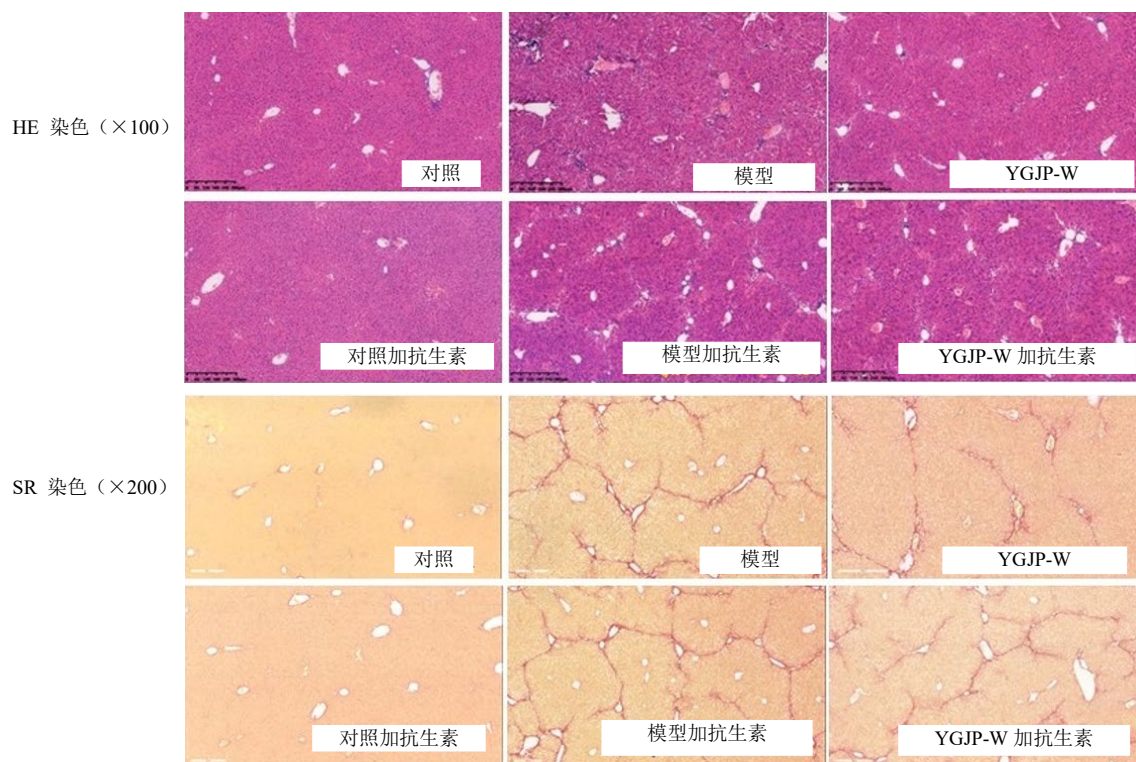
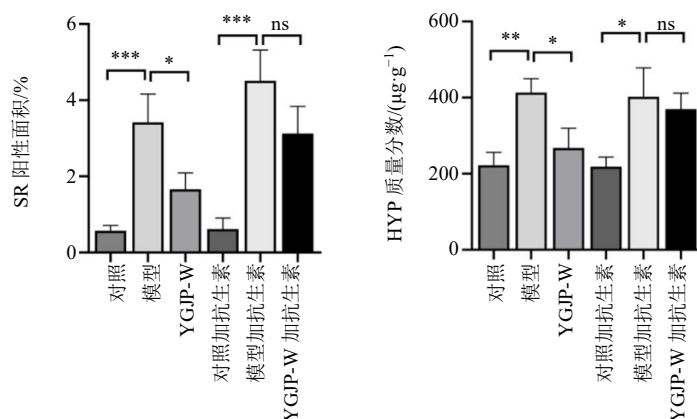


图 8 小鼠肝组织病理 HE 和 SR 染色

Fig. 8 HE and SR staining of liver tissue in mice

染色结果显示, 对照组小鼠肝组织仅在汇管区可见少量胶原纤维沉积; 模型组小鼠肝组织出现大量胶原沉积, 以汇管区为中心向四周呈发散状分布; 与模型组相比, YGJP-W 组肝组织内胶原沉积显著减少。HYP 和 SR 半定量结果见图 9, 与对照组相比, 模型组肝组织内 HYP 质量分数显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组相比, YGJP-W 组 HYP 含量显著下降 ($P < 0.05$)。天狼星红染色胶原半定量结果显示, 与对照组相比, 模型组小鼠肝组织胶原面积显著

著增加 ($P < 0.001$); YGJP-W 组胶原面积较模型组显著下降 ($P < 0.05$)。HE 染色结果显示, 抗生素耗后, 与对照加抗生素组相比, 模型加抗生素组小鼠肝小叶结构严重破坏, 存在大量的炎性细胞浸润及组织坏死; YGJP-W 加抗生素组炎性细胞浸润及组织坏死较模型加抗生素组并无显著改善。SR 染色结果显示, 与对照加抗生素组相比, 模型加抗生素组小鼠肝组织存在大量胶原沉积, 且 YGJP-W 加抗生素组肝组织内胶原沉积并未得到改善。HYP

图 9 小鼠肝组织 HYP 含量和 SR 阳性面积 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)Fig. 9 HYP content and SR positive area of liver tissue in mice ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

和 SR 半定量结果见图 9, 与对照加抗生素组相比, 模型加抗生素组的肝组织内 HYP 质量分数显著增加 ($P < 0.05$); 与模型加抗生素组相比, YGJP-W 加抗生素组 HYP 质量分数并未显著下降 ($P > 0.05$)。天狼星红染色胶原半定量结果显示, 与对照加抗生素组相比, 模型加抗生素组小鼠肝组织胶原面积显著增加 ($P < 0.001$); YGJP-W 加抗生素组胶原面积较模型加抗生素组并未显著下降 ($P > 0.05$), 同样提示 YGJP-W 抑制胶原沉积作用为菌群依赖性。

3.3.3 对 CCl₄ 肝纤维化小鼠 α -平滑肌肌动蛋白

(α -smooth muscle actin, α -SMA) 和 CoL-I 表达的影响 Real-time PCR 结果见图 10, 与对照组比较, 模型组小鼠肝组织 α -SMA 和 CoL-I mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, YGJP-W 组小鼠肝组织 α -SMA 和 CoL-I mRNA 表达水平有不同程度降低 ($P < 0.01, 0.05$)。抗生素耗竭后, 与对照加抗生素组相比, 模型加抗生素组小鼠肝组织 α -SMA 和 CoL-I mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.001$); 然而, 与对照加抗生素组相比, YGJP-W 加抗生素组不能降低小鼠肝组织 α -SMA 和 CoL-I mRNA 表达水平 ($P > 0.05$), 结果提示 YGJP-W 抑制肝纤维化为菌群依赖性。

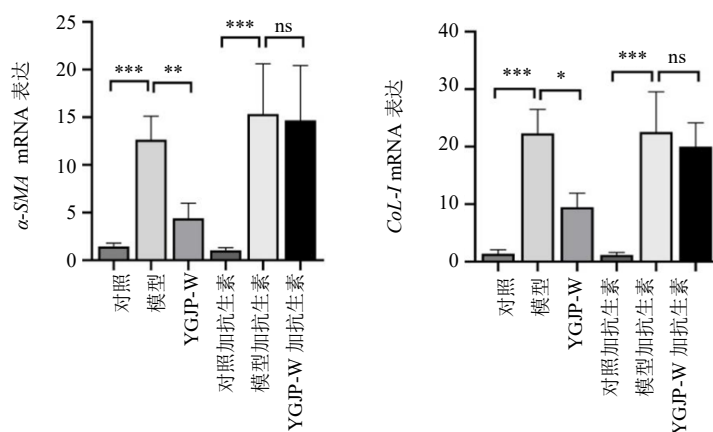


图 10 小鼠肝组织 α -SMA 和 CoL-I mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Fig. 10 α -SMA and CoL-I mRNA expression of liver tissue in mice ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

4 讨论

多糖是一类广泛存在于中药中的高分子聚合物, 现代研究已证明多糖是中药中一类重要的活性物质基础, 表现出包括抗肿瘤、免疫调节、改善糖脂代谢、保肝以及抗病毒在内的多种功能^[23-25]。中药汤剂因其制法简便, 见效迅速的优势, 是中药最常用和最经典的剂型之一。长期以来, 关于中药药效物质基础的研究多集中在各类亲脂性小分子成分, 例如生物碱、黄酮、萜类等, 多糖作为中药汤剂中主要存在的一类生物活性大分子物质, 由于技术及认识的局限, 研究相对缺乏。本研究关注一贯煎的多糖类成分, 并从中制备得到活性多糖 YGJP-W, 其得率高达 11.60%, 药效学实验表明 YGJP-W 具有显著的抗肝纤维化活性, 提示多糖类成分 YGJP-W 是一贯煎的重要活性物质基础之一。YGJP-W 是由 YGJP 过弱阴离子交换树脂, 经水洗脱所得, 由于糖醛酸能够被弱阴离子交换树脂吸附, 水的离子强度低, 只能将中性糖洗脱, 很难将糖醛

酸洗脱。本研究中, 糖醛酸检测, 单糖组成分析及 FT-IR 分析检测结果均说明 YGJP-W 为中性多糖, 几乎不含糖醛酸, 与分离流程相一致, 同时说明 YGJP 在弱阴离子交换树脂的上样量合理, 不存在过载行为。化学分析显示 YGJP-W 是由半乳糖、葡萄糖、甘露糖和果糖构成, 其物质的量比为 1.0 : 2.8 : 1.4 : 1.6, 葡萄糖和果糖是 YGJP-W 中含量最多的 2 类单糖。考虑到葡聚糖是北沙参中的特征性多糖, 果聚糖是麦冬中的特征性多糖, 因此, 我们合理地推测 YGJP-W 中含有葡聚糖和果聚糖类, 而半乳糖和甘露糖则可能以不同类型的杂多糖的形式存在。但需要注意的是, 一贯煎由生地黄、北沙参、麦冬、当归、枸杞和川楝子组成, 该 6 味中药中含有的多糖被报道由各种不同类型的单糖组成, 除了上述 4 种, 还含有阿拉伯糖、木糖、鼠李糖等, 但这些单糖没有在 YGJP-W 中检测到, 推测可能转移到 YGJP-0.2 或 YGJP-0.5 部分, 但这个问题是否涉及到多糖类成分在中药配伍共煎过程中的变化, 还

有待进一步研究阐明。

鉴于多糖口服吸收利用率低,其代谢途径有待进一步阐明,关于多糖口服后如何发挥药理活性是困扰多糖研究的关键科学问题之一。近年来,越来越多的研究证实肠道菌群与多种疾病密切相关,通过影响肠道菌群能够改善多种疾病已得到明确^[26]。多糖是调节肠道菌群的重要物质,因此,肠道菌群为中药多糖的作用机制研究提供了一条重要途径。为了解释 YGJP-W 对 CCl₄ 诱导小鼠肝纤维化的干预作用与调节肠道菌群相关,对 YGJP-W 干预后的小鼠菌群进行了分析。本研究虽然发现了 YGJP-W 能够逆转 CCl₄ 引起的小鼠肠道菌群结构变化,并通过抗生素联合 YJGP-W 干预实验证明了 YJGP-W 发挥抗肝纤维化的作用可能与其调控肠道菌群相关。但是 YJGP-W 具体是怎样通过调控肠道菌群发挥活性还不清楚,是通过影响肠道菌群的代谢产物,包括短链脂肪酸,长链脂肪酸,胆汁酸,支链氨基酸等发挥活性?还是 YJGP-W 被肠道菌群酵解后进而直接发挥活性?有待进一步研究阐明。本研究中十分值得关注的是在 16S rRNA 测序结果中发现,在所有菌属中,狄氏副拟杆菌属 *Parabacteroides* 变化最为显著。与对照组相比,模型小鼠粪便中狄氏副拟杆菌属明显减少,YGJP-W 可回调这种变化。已有研究报道狄氏副拟杆菌 *Parabacteroides distasonis* 可有效抑制小鼠 NASH^[27];改善小鼠代谢综合征和肥胖症^[28];补充狄氏副拟杆菌可通过调节胆汁酸代谢改善硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA)和蛋氨酸胆碱缺乏饲料(methionine-and choline deficient diet, MCD)饮食诱导的小鼠肝纤维化^[29]、增加未结合的胆汁酸,如 UDCA 和 LCA 和盲肠内容物中的 BSH 活性^[30];临床研究报告 NAFLD、新生儿胆汁淤积疾病患者和肝纤维化患者肠道中狄氏副拟杆菌水平降低^[31];这些已报道的研究均表明增加狄氏副拟杆菌可有效减轻慢性肝病的严重程度,延缓疾病进展,而本研究提示一贯煎 YGJP-W 可能通过增加肠道狄氏副拟杆菌等改善肝纤维化,但该问题也有待下一步研究证实。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 程宁,李吉彦,李梅,等.乙肝相关肝纤维化的中西医结合治疗进展与思考[J].中国中医药现代远程教育,2023,21(24):197-199.
- [2] 凌清儿,张戎.肝纤维化治疗的研究进展[J].现代医

药卫生,2023,39(11):1926-1931.

- [3] 徐列明,刘平,沈锡中,等.肝纤维化中西医结合诊疗指南(2019 年版)[J].中国中西医结合杂志,2019,39(11):1286-1295.
- [4] Mo Z Z, Lin Z X, Su Z R, et al. *Angelica sinensis* supercritical fluid CO₂ extract attenuates D-galactose-induced liver and kidney impairment in mice by suppressing oxidative stress and inflammation [J]. *J Med Food*, 2018, 21(9): 887-898.
- [5] Liu Z G, Zhu P T, Zhang L, et al. Autophagy inhibition attenuates the induction of anti-inflammatory effect of catalpol in liver fibrosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 1262-1271.
- [6] 孟月,刘文兰,孙福慧.一贯煎抑制肝星状细胞活化作用机制的研究[J].环球中医药,2018,11(3):326-330.
- [7] Li Z J, Gou H Z, Zhang Y L, et al. Role of intestinal flora in primary sclerosing cholangitis and its potential therapeutic value [J]. *World J Gastroenterol*, 2022, 28(44): 6213-6229.
- [8] Frazier K, Manzoor S, Carroll K, et al. Gut microbes and the liver circadian clock partition glucose and lipid metabolism [J]. *J Clin Invest*, 2023, 133(18): e162515.
- [9] Jin C, Zhou T T, Duan Z H, et al. Effect of chin brick tea [*Camellia sinensis* (L.) Kuntze] on lipid metabolism and inflammation by modulating intestinal flora and bile acids in mice with non-alcoholic fatty liver disease [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 318(Pt B): 116950.
- [10] 杨文珣,靳凤云,陈永祥,等.一贯煎中糖的含量测定[J].海峡药学,1999,(02):39-40.
- [11] 胡钰莹,陈丽,李淑萍,等.经典名方一贯煎的历史沿革、现代研究进展和质量标志物(Q-Marker)预测分析[J].中草药,2022,53(23):7585-7595.
- [12] 王清泉,宋景,李亚男,等.地黄多糖的提取纯化及药理作用研究进展[J].中草药,2023,54(11):3734-3744.
- [13] 唐婷.地黄多糖提取纯化、结构表征及生物活性研究[D].贵阳:贵州师范大学,2023.
- [14] 景永帅,张浩,程文境,等.北沙参多糖的提取工艺、理化性质和生物活性研究进展[J].食品安全质量检测学报,2022,13(08):2610-2617.
- [15] 贾姝鑫,宋志慧,高春燕,等.麦冬多糖调控胰高血糖素样肽-1对妊娠期糖尿病大鼠肠道菌群及糖代谢的影响[J].陕西中医,2023,44(04):427-432.
- [16] 崔阳阳,杨丽霞,米登海,等.当归多糖对糖尿病 KK-Ay 小鼠心肌细胞凋亡的影响[J].中国药房,2023,34(10):1211-1215.
- [17] 韩玲,赵伟.枸杞多糖通过 miR-29b/MAPK1 通路发挥视网膜血管内皮细胞的抗凋亡作用[J].解剖学研究,2023,45(6):555-561.

- [18] Wu J J, Chen M M, Shi S S, *et al.* Hypoglycemic effect and mechanism of a pectic polysaccharide with hexenuronic acid from the fruits of *Ficus pumila* L. in C57BL/KsJ db/db mice [J]. *Carbohydrat Polym*, 2017, 178: 209-220.
- [19] Wu J J, Xu Y B, Zhu B, *et al.* Characterization of an arabinogalactan from the fruit hulls of *Ficus pumila* Linn. and its immunomodulatory effect [J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 73: 104091.
- [20] Li X J, Xiao S J, Chen J, *et al.* Inulin-type fructans obtained from *Atractylodis Macrocephalae* by water/alkali extraction and immunoregulatory evaluation [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 230: 123212.
- [21] Zhang X, Bi C L, Shi H C, *et al.* Structural studies of a mannoglucan from *Cremastra appendiculata* (Orchidaceae) by chemical and enzymatic methods [J]. *Carbohydrat Polym*, 2021, 272: 118524.
- [22] 戚胜兰. 桃红四物汤抗原发性痛经和非酒精性脂肪性肝炎的效应物质基础研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2023.
- [23] Zong A Z, Cao H Z, Wang F S. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research [J]. *Carbohydrat Polym*, 2012, 90(4): 1395-1410.
- [24] Yang Y, Ji J, Di L Q, *et al.* Resource, chemical structure and activity of natural polysaccharides against alcoholic liver damages [J]. *Carbohydrat Polym*, 2020, 241: 116355.
- [25] Wu J J, Shi S S, Wang H J, *et al.* Mechanisms underlying the effect of polysaccharides in the treatment of type 2 diabetes: A review [J]. *Carbohydrat Polym*, 2016, 144: 474-494.
- [26] Albillos A, de Gottardi A, Rescigno M. The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy [J]. *J Hepatol*, 2020, 72(3): 558-577.
- [27] Wei W C, Wong C C, Jia Z J, *et al.* *Parabacteroides distasonis* uses dietary inulin to suppress NASH via its metabolite pentadecanoic acid [J]. *Nat Microbiol*, 2023, 8(8): 1534-1548.
- [28] Yang J Y, Lee Y S, Kim Y, *et al.* Gut commensal *Bacteroides acidifaciens* prevents obesity and improves insulin sensitivity in mice [J]. *Mucosal Immunol*, 2017, 10(1): 104-116.
- [29] Zhao Q, Dai M Y, Huang R Y, *et al.* *Parabacteroides distasonis* ameliorates hepatic fibrosis potentially via modulating intestinal bile acid metabolism and hepatocyte pyroptosis in male mice [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 1829.
- [30] Li M C, Wang S L, Li Y T, *et al.* Gut microbiota-bile acid crosstalk contributes to the rebound weight gain after caloric restriction in mice [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 2060.
- [31] Li, M, Liu S X, Wang M Y, *et al.* Gut microbiota dysbiosis associated with bile acid metabolism in neonatal cholestasis disease [J]. *Sci Rep*, 2020, 10: 7686.

[责任编辑 王文倩]