

黄芩汤治疗蓖麻油致小鼠腹泻的作用及机制研究

陈文露^{1,2,3}, 彭新宇^{1*}, 康桦华¹, 潘育方³, 唐兴刚¹, 蒋顺进⁴, 黄炜乾⁴, 丁焕中⁵, 黄婷^{1,6}, 徐志宏¹

1. 广东省农业科学院动物卫生研究所, 广东 广州 510640
2. 惠东县人民医院, 广东 惠州 516399
3. 广东药科大学, 广东 广州 510006
4. 广东容大生物股份有限公司, 广东 清远 511517
5. 华南农业大学, 广东 广州 510642
6. 仲恺农业工程学院 动物科技学院, 广东 广州 510225

摘要: **目的** 研究黄芩汤对蓖麻油致小鼠腹泻模型的作用及作用机制。**方法** 昆明小鼠随机分为对照组、模型组、洛哌丁胺 (5 mg/kg) 组和黄芩汤高、中、低剂量 (20、10、5 g/kg) 组, 每组 10 只。连续 3 d 给药, 末次给药 30 min 后 ig 0.5 mL 蓖麻油制备腹泻模型。测定腹泻评分和腹泻指数, 采用 qRT-PCR 检测肝脏中 α -1-酸性糖蛋白 (α 1-acid glycoprotein, AGP)、C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP)、转铁蛋白 (transferrin, TRF)、白蛋白 (albumin, ALB) 和小肠中水通道蛋白 3 (aquaporin 3, AQP3)、AQP4、Na/H 离子交换器 2 (Na/H exchanger 2, NHE2)、NHE3、NHE8 mRNA 表达; 采用免疫组化法和 Western blotting 检测小肠中 AQP3 和 NHE8 蛋白表达; 收集肠道内容物, 进行 16S rRNA 测序。**结果** 黄芩汤显著降低小鼠的腹泻评分和腹泻指数 ($P < 0.05$), 下调肝脏 AGP、CRP 的 mRNA 表达 ($P < 0.05$), 下调小肠 AQP3、NHE8 的 mRNA 和蛋白表达 ($P < 0.05$), 降低双歧杆菌属 *Bifidobacterium*、粪杆菌属 *Faecalibaculum* 和 Ruminococcaceae_UCG-014 丰度, 增加 *Jeotgalicoccus* 和 *Candidatus Arthromitus* 丰度, 降低厚壁菌门 (Firmicutes) 与拟杆菌门 (Bacteroidetes) 的比值。

结论 黄芩汤可能通过下调肠上皮转运蛋白和急性期蛋白表达, 改变肠道菌群, 从而减轻蓖麻油引起的腹泻。

关键词: 黄芩汤; 16S rRNA; 腹泻; 肠上皮转运蛋白; 急性期蛋白; 肠道菌群; 芍药苷; 黄芩苷; 黄芩素; 汉黄芩苷; 甘草酸铵

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)05-1590-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.05.017

Effect and mechanism of Huangqin Decoction in treatment of castor oil-induced diarrhea mice

CHEN Wenlu^{1,2,3}, PENG Xinyu¹, KANG Huahua¹, PAN Yufang³, TANG Xinggang¹, JIANG Shunjin⁴, HUANG Weiqian⁴, DING Huanzhong⁵, HUANG Ting^{1,6}, XU Zhihong¹

1. Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China
2. Huidong People's Hospital, Huizhou 516399, China
3. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China
4. Guangdong Rongda Biology Co., Ltd., Qingyuan 511517, China
5. South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China
6. College of Animals Science & Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China

收稿日期: 2023-10-09

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目 (2020B0202080004); 科技创新战略专项资金 (高水平农科院建设) (R2020PY-JC001); 广东省农业科学院驻镇帮扶村农村科技特派员项目 (KTP20210010); 广东省现代农业产业园项目-韶关翁源家禽产业园 (GDSCYY2021-021); 广东省医院药学研究基金 (澳美基金) (2023A23); 惠州市科技计划项目 (2022CZ010371); 清远市 2023 年省科技创新战略专项 (大专项+任务清单) 项目 (2023DZX012); 广东省畜禽疫病防治研究重点实验室 (2023B1212060040)

作者简介: 陈文露, 女, 硕士, 主管药师, 从事药理学研究和药事管理。E-mail: 892234345@qq.com

***通信作者:** 彭新宇, 男, 硕士, 研究员, 主要从事中药药理学和动物医学研究。E-mail: 996202250@qq.com

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of Huangqin Decoction (黄芩汤) on castor oil-induced diarrhea model in mice. **Methods** Kunming mice were randomly divided into control group, model group, loperamide (5 mg/kg) group, and Huangqin Decoction high-, medium-, and low-dose (20, 10, 5 g/kg) groups, with 10 mice in each group. Drugs were administered intragastrically for three consecutive days, a diarrhea model was prepared by administering 0.5 mL castor oil at 30 min after the last administration. Diarrhea score and diarrhea index were measured, and qRT-PCR was used to detect mRNA expressions of alpha 1-acid glycoprotein (AGP), C-reactive protein (CRP), transferrin (TRF), albumin (ALB) in liver and aquaporin 3 (AQP3), AQP4, Na/H exchanger 2 (NHE2), NHE3 and NHE8 in small intestine; Immunohistochemistry and Western blotting were used to detect the expressions of AQP3 and NHE8 proteins in small intestine; Intestinal contents were collected for 16S rRNA sequencing. **Results** Huangqin Decoction significantly reduced the diarrhea score and diarrhea index of mice ($P < 0.05$), downregulated the mRNA expressions of AGP and CRP in liver ($P < 0.05$), downregulated the mRNA and protein expressions of AQP3 and NHE8 in small intestine ($P < 0.05$), reduced the abundance of *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium* and *Ruminococcaceae_UCG-014*, increased the abundance of *Jeotgallicoccus* and *Candidatus_Arthromitus*, decreased the ratio of Firmicutes to Bacteroidetes. **Conclusion** Huangqin Decoction may downregulate the expressions of intestinal epithelial transport proteins and acute phase proteins, alter gut microbiota, and thus alleviate diarrhea caused by castor oil. **Key words:** Huangqin Decoction; 16S rRNA; diarrhea; intestinal epithelial transport protein; acute phase protein; intestinal flora; paeoniflorin; baicalin; baicalein; wogonoside; ammonium glycyrrhizinate

腹泻是指大便频次增多,粪便呈半流质或水样,伴有腹部胀满、腹痛等症状的一种消化系统疾病^[1]。急性腹泻在发展中国家仍与发病率和死亡率增加有关,而用于治疗腹泻的抗生素常导致耐药性和菌群失调,因此,由于中药止泻具有较低的不良反和良的功,越来越受到研究者的关注。

目前,腹泻模型有细菌^[2]、降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)^[3]、脂多糖^[4]和蓖麻油^[4]诱导的腹泻模型。研究表明,水通道蛋白(aquaporins, AQPs)、Na/H 离子交换器(Na/H exchangers, NHEs)和急性期蛋白(acute phase proteins, APPs)的水平与蓖麻油致腹泻相关,肠道的关键功能是吸收水分^[5],APPs 控制肠道内的跨上皮液运输^[6]。AQP3 和 AQP4 在鼠肠道内定位,在腹泻时下调^[7-9],可能影响水分吸收。目前已知 10 种哺乳动物 NHEs 亚型,其中 NHE1、NHE2、NHE3 和 NHE8 在肠上皮^[10]中已被鉴定,均在细胞膜刷缘区高表达^[11],NHE3 为主要亚型^[12]。NHE3 缺陷小鼠 Na⁺吸收缺陷,酸碱失衡^[13],导致自发性轻度腹泻和酸中毒^[14]。NHE8 对 Na⁺吸收也至关重要^[15],可以维持肠内的黏膜稳态^[16]。NHE2 的破坏改变了黏液层的酸性分泌,减少肠壁和原酶细胞的数量,影响肠道屏障恢复^[17]。包括 α -1-酸性糖蛋白(α -1-acid glycoprotein, AGP)、转铁蛋白(transferrin, TRF)、白蛋白(albumin, ALB)和 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)在内的 APPs 主要由肝细胞合成,是创伤、感染、应激、肿瘤和炎症所触发的先天急性期反应的一部分^[18-19]。

肠道菌群是一个密集多样的生态系统,涉及生

理和病理过程。一方面,正常的肠道菌群通过帮助新陈代谢、排除毒素和维持肠道屏障功能来影响宿主的健康。另一方面,肠道菌群失调涉及多种疾病和炎症反应^[20-28]。黄芩汤由黄芩、芍药、甘草和红枣组成^[29],最早出现在中医论著《伤寒论》中,主要用于治疗胃肠道疾病如腹泻、腹部痉挛、发热、头痛、呕吐、恶心、极度口渴、心脏下胀等。多年的临床治疗经验表明,黄芩汤治疗胃肠道疾病安全有效。研究发现,黄芩汤可减少癌症治疗相关的毒性的影响^[30-31],可以通过激活 Wnt 通路来修复损伤肠道上皮细胞,并通过下调诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、环氧酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)和核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)缓解炎症^[27]。然而,黄芩汤的止泻机制尚不明确。因此,本研究从肠道菌群、APPs、AQPs、NHEs 的肠道表达等方面评价了黄芩汤对蓖麻油致腹泻的影响。

1 材料

1.1 动物

SPF 级昆明小鼠 60 只,雌雄各半,3~4 周龄,体质量 18~20 g,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司提供,许可证号 SCXK(鲁)20140007。动物在温度(23.0 $\pm$ 1.5) $^{\circ}$ C、相对湿度(50 $\pm$ 15)%环境下饲养。动物实验经广东省农业科学院动物卫生研究所动物伦理委员会批准(批准号 20180107003)。

1.2 药材

黄芩、芍药、甘草和红枣(批号分别为 20170911、20180506、20180620、20180523)购自广东省广州市大参林药店,经广东药科大学中医学

院程轩轩教授分别鉴定为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎、鼠李科植物枣 *Ziziphus jujuba* Mill. 的干燥成熟果实。

1.3 药品与试剂

对照品黄芩苷(批号 P16S8F44143)、黄芩素(批号 CO2A6Y1)、汉黄芩苷(批号 P09J8F28374)购自上海源叶生物技术有限公司,质量分数均 $\geq 98\%$;对照品芍药苷(批号 17031901,质量分数为 99.3%)、甘草酸铵(批号 17060510,质量分数为 99.45%)购自北京恒元启天化工技术研究院;盐酸洛哌丁胺胶囊(批号 20170820)购自西安杨森制药有限公司;蓖麻油(批号 151111)购自湖北科田药业有限公司;中性通用型组织固定液(批号 YP184305)、Trizol 溶液(批号 182805)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(批号 GB23303)购自武汉塞维尔生物科技有限公司;PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒(批号 10247)购自日本 TaKaRa 公司;RNase-Free Water(批号 EC05BA0039)购自上海生工生物工程技术服务有限公司;NHE8 兔抗(批号 24K4519)购自 Affinity 公司;APQ3 兔抗(批号 CPA4133)购自 Cohesion Biosciences 公司;GAPDH 小鼠单抗(批号 KC-5G4)购自上海康成生物工程有限公司;HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 二抗(批号 BA1050)购自武汉博士德生物工程有限公司;DNA 抽提试剂盒(批号 CLS-D6382-01)购自美国 Bio Tek 公司。

1.4 仪器

Agilent 1260 型超高液相色谱仪(美国 Agilent 公司);XS 型十万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);DS-FI2 型显微镜(日本 Nikon 公司);Epoch 2 型超微量分光光度计、EL800 型酶标仪(美国 Bio Tek 公司);TBS380 型微型荧光计(美国 Turner Biosystems 公司);Light Cycle 480 型高通量实时荧光定量 PCR 仪(瑞士罗氏公司);5418 型高速离心机(德国 Eppendorf 公司);DW-86W420 型低温冰箱(青岛海尔特种电器有限公司);HISEQ 型测序仪(美国 Illumina 公司)。

2 方法

2.1 黄芩汤制备和质量控制

2.1.1 黄芩汤的制备 经 UPLC 检测本研究所用药材黄芩中黄芩苷质量分数为 13.19%,白芍中芍药苷

质量分数为 3.1%,甘草中甘草酸铵质量分数为 2.29%,符合《中国药典》2020 年版规定。称取黄芩 90 g、芍药 60 g、甘草 60 g、红枣 60 g,加入 15 倍量的水煮沸 2 h,滤过;残渣再加入 10 倍量的水煮沸提取 1 h,滤过。合并 2 次提取液,浓缩至 1 g/mL,冷却至 4 ℃。

2.1.2 黄芩汤的质量控制

(1)对照品溶液的制备:分别称定芍药苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和甘草酸铵 0.020 5、0.020 5、0.010 0、0.010 1、0.010 3 g 于 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解即得对照品储备液。取对照品储备液,稀释制备系列梯度质量浓度的对照品溶液,芍药苷质量浓度为 40、60、80、100、120 mg/mL,黄芩苷质量浓度为 120、140、160、200、220 mg/mL;黄芩素质量浓度为 10、30、50、70、90 mg/mL,汉黄芩苷质量浓度为 8、10、20、40、80 mg/mL,甘草酸铵质量浓度为 20、40、60、80、100 mg/mL。

(2)色谱条件:Poroshell 120 EC-C₁₈ 色谱柱(100 mm×3 mm, 2.7 μm),流动相为 0.2%磷酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱:0~4 min, 90% A;4~5 min, 90%~80% A;5~15 min, 80%~50% A;15~16 min, 50%~0 A;16~17 min, 0~90% A。体积分流量 0.6 mL/min;柱温 40 ℃;检测波长 230 nm。

(3)样品检测:黄芩汤提取物用蒸馏水稀释至 0.02 g/mL,经 0.22 μm 膜滤过,按照色谱条件进样检测。

2.2 分组、造模及给药

小鼠适应性饲养 7 d 后,随机分为对照组、模型组、洛哌丁胺(5 mg/kg)组和黄芩汤高、中、低剂量(20、10、5 g/kg)组,每组 10 只。给药组 ig 相应药物,对照组和模型组 ig 等体积的生理盐水,1 次/d,连续 3 d。第 2 天晚上给药后小鼠禁食不禁水,第 3 天给药 30 min 后,除对照组外其余小鼠 ig 0.5 mL 蓖麻油制备腹泻模型。

2.3 腹泻评分和腹泻指数的测定

造模后,将小鼠放在不同的笼子里(每笼 1 只),在滤纸上收集粪便,计算腹泻评分和腹泻指数。腹泻评分:正常便 0 分,半固体便 2 分,水样便 3 分。稀便等级:稀便直径小于 1 cm 为 1 级,直径为 1.0~1.9 cm 为 2 级,直径为 2.0~3.0 cm 为 3 级,直径>3.0 cm 为 4 级。

稀便率=小鼠稀便次数/小鼠总排便次数

稀便级数=稀便等级数之和/稀便次数

腹泻指数=稀便率×稀便级数

2.4 qRT-PCR 检测肝脏 *AGP*、*ALB*、*TRF*、*CRP* 和小肠 *NHE2*、*NHE3*、*NHE8*、*AQP3*、*AQP4* 基因表达

造模 4 h 后小鼠安乐死，取小鼠肝脏和小肠。按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA，进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
<i>AGP</i>	F: CCAGAAGGCTGTCACACACG R: GCTTCTTCTCCTGCTGACCG
<i>ALB</i>	F: CTACAGCGGAGCAACTGAAGACTG R: GGTGTCCTTGTCAGCAGCCTTG
<i>TRF</i>	F: GCTGCTCCTCCACTCAACCATTG R: CCTCATACTGATCCACTGGCTTGC
<i>CRP</i>	F: CAGAGATTCTGAGGCTCCAACA R: AGTCACCGCCATACGAGTCCTG
<i>NHE2</i>	F: TTACCTAAGAACACAAAGCTTCCAG R: GAGCACAGTGGTTCCAACATC
<i>NHE3</i>	F: CTTGCGCTTCTGCTGTCCTTG R: CTTGCGCTTCTGCTGTCCTTG
<i>NHE8</i>	F: CTTGCGCTTCTGCTGTCCTTG R: CTTGCGCTTCTGCTGTCCTTG
<i>AQP3</i>	F: GAGATGCTTACATCCGCTACCG R: CCAGCCACCAAGATGCCAAGG
<i>AQP4</i>	F: GGAGCTACATGGAGGTGGAGGAC R: GGAGCTACATGGAGGTGGAGGAC
<i>β-actin</i>	F: GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG R: ATGCCACAGGATTCCATACC

2.5 免疫组化检测小肠 *NHE8* 和 *AQP3* 蛋白表达

取各组小肠组织，于 4%多聚甲醛中固定，石蜡包埋，切成 4 μm 切片。3%牛血清白蛋白封闭后，滴加 *AQP3* (1:800)、*NHE8* (1:100) 抗体孵育，PBS 洗涤后，滴加二抗室温孵育 5 min，DAB 显色、苏木素染色后，脱水、透明、封片，于显微镜下观察并拍照。

2.6 Western blotting 检测小肠 *NHE8* 和 *AQP3* 蛋白表达

取各组小肠组织，剪碎后加入 RIPA 裂解液提取蛋白。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，于 5%脱脂牛奶中封闭，分别加入 *NHE8*、*AQP3* 抗体孵育，洗涤后加入二抗孵育，用全自动凝胶成像分析系统采集条带。

2.7 16S rRNA 基因测序

2.7.1 16S rRNA 的提取和扩增 取各组小肠组织，

根据 E.Z.N.A.[®] soil 试剂盒说明书进行总 DNA 抽提，用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGC-AG-3')和 806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对 V3~V4 可变区进行 PCR 扩增，扩增程序：95 ℃预变性 3 min，95 ℃变性 30 s、55 ℃退火 30 s、72 ℃延伸 30 s (27 个循环)，72 ℃延伸 10 min。

2.7.2 Illumina Miseq 测序 采用 2%琼脂糖凝胶电泳回收 PCR 产物，利用 AxyPrep DNA Gel Extraction 试剂盒对产物进行纯化，Tris-HCl 洗脱，2%琼脂糖电泳检测。利用微量荧光计进行定量分析。根据 Illumina MiSeq 平台标准操作规程将纯化后的扩增片段构建 PE 2*300 的文库。构建文库步骤：(1) 连接“Y”字形接头；(2) 使用磁珠筛选去除接头自连片段；(3) 利用 PCR 扩增进行文库模板的富集；(4) 氢氧化钠变性，产生单链 DNA 片段。送至上海美吉生物医药科技有限公司进行测序分析。

2.8 统计学分析

采用 Spass 23 软件进行统计分析，组间差异比较用单因素方差 (One-way ANOVE) 分析，采用 GraphPad Prism 7 软件作图。

3 结果

3.1 黄芩汤的成分分析

以芍药苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、甘草酸铵为对照品，采用 UPLC 对黄芩汤的成分进行分析。对照品和黄芩汤样品的色谱图见图 1，峰面积 (Y) 与质量浓度 (X) 呈线性关系 (表 2)，表明芍

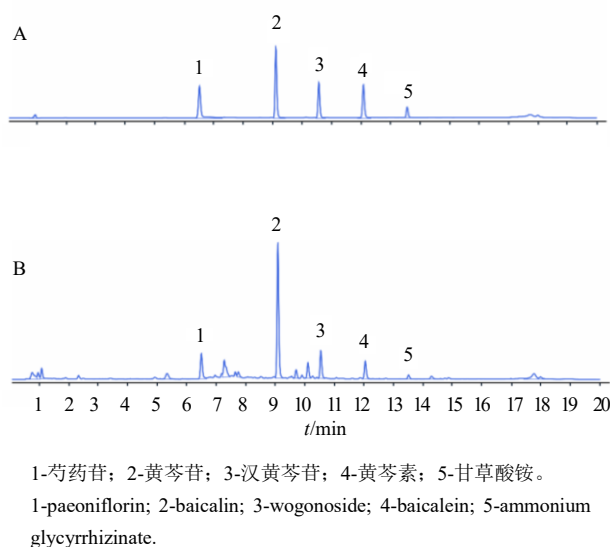


图 1 对照品 (A) 和黄芩汤 (B) 的 UPLC 色谱图
Fig. 1 UPLC chromatograms of reference substance (A) and Huangqin Decoction (B)

表 2 各成分的回归方程、线性范围和相关系数

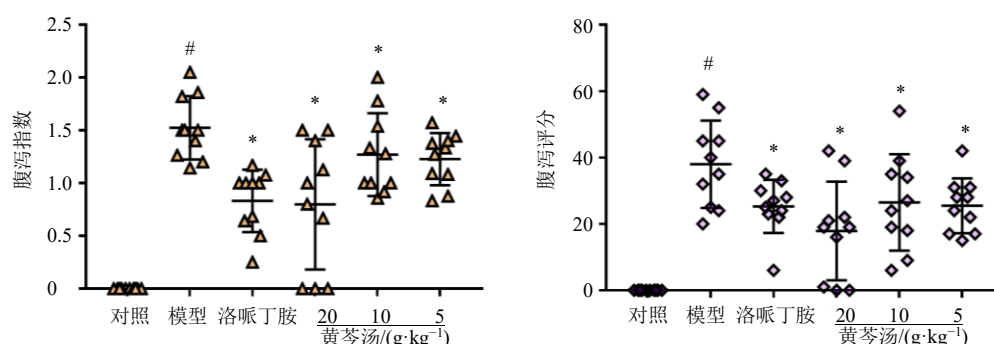
Table 2 Regression equations, linear ranges and correlation coefficients for each component

成分	回归方程	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	R^2
芍药苷	$Y=7.8258X-34.502$	40~120	0.9993
黄芩苷	$Y=9.2607X-268.14$	120~220	0.9992
汉黄芩苷	$Y=7.0744X-4.0189$	10~90	0.9996
黄芩素	$Y=12.122X-17.056$	8~80	0.9995
甘草酸铵	$Y=1.9726X-0.9905$	20~100	0.9993

药苷、黄芩苷、黄芩素、黄芩苷、甘草酸铵在各自的质量浓度范围内线性关系良好。作为黄芩汤的主要成分，芍药苷来源于芍药，而黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷来源于黄芩，甘草酸铵来源于甘草。1 kg 黄芩汤药材可提取干燥成 93 g 提取物粉末，芍药苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和甘草酸铵质量浓度分别为 100.32、186.51、69.89、25.05、61.26 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.2 黄芩汤对腹泻小鼠腹泻指数和腹泻评分的影响

如图 2 所示，与对照组比较，模型组小鼠腹泻



与对照组比较：# $P<0.05$ ；与模型组比较：* $P<0.05$ ，下同。

$P<0.05$ vs control group; * $P<0.05$ vs model group, same as below figures.

图 2 黄芩汤对腹泻小鼠腹泻指数和腹泻评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)Fig. 2 Effect of Huangqin Decoction on diarrhea index and diarrhea score in diarrhea mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

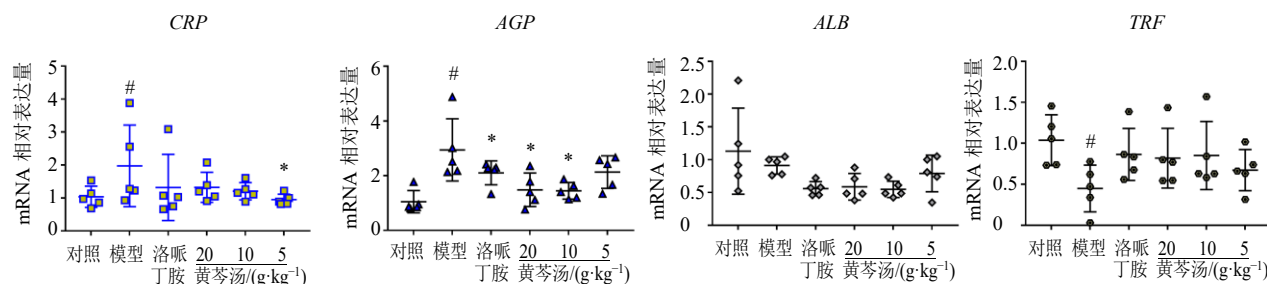
指数和腹泻评分明显升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，各给药组小鼠腹泻指数和腹泻评分均显著降低 ($P<0.05$)。

3.3 黄芩汤对腹泻小鼠肝脏 AGP、ALB、TRF、CRP 和小肠 NHE2、NHE3、NHE8、AQP3、AQP4 基因表达的影响

如图 3 所示，与对照组比较，模型组小鼠肝脏中 CRP 和 AGP mRNA 表达水平明显升高 ($P<0.05$)，TRF mRNA 表达水平明显降低 ($P<0.05$)；与模型组比较，黄芩汤低剂量组 CRP mRNA 表达

水平显著降低 ($P<0.05$)，洛哌丁胺组和黄芩汤中、高剂量组 AGP mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$)。

如图 4 所示，与对照组比较，模型组小鼠小肠中 AQP3、NHE3 和 NHE8 mRNA 表达水平均明显升高 ($P<0.05$)，AQP4 mRNA 表达水平明显降低 ($P<0.05$)；与模型组比较，洛哌丁胺组和黄芩汤中、高剂量组 AQP3 mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$)。黄芩汤各剂量组 NHE8 mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$)。

图 3 黄芩汤对腹泻小鼠肝脏 CRP、AGP、ALB 和 TRF 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)Fig. 3 Effect of Huangqin Decoction on CRP, AGP, ALB and TRF gene expressions in liver of diarrhea mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

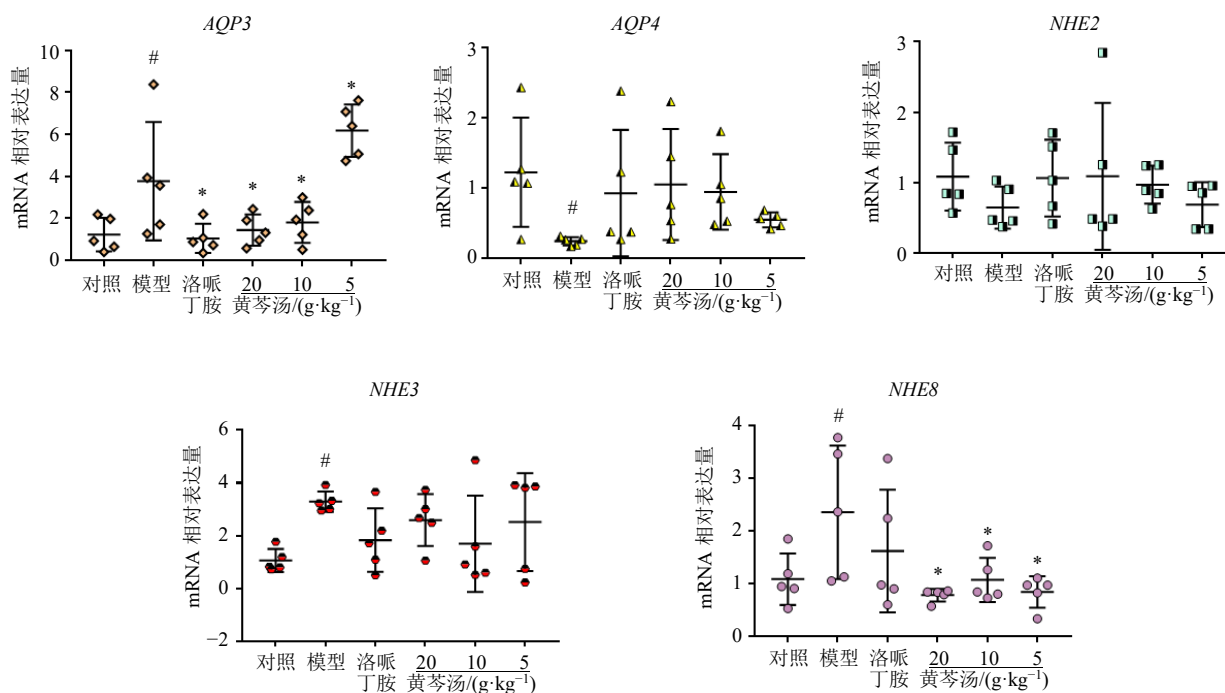


图 4 黄芩汤对腹泻小鼠小肠 AQP3、AQP4、NHE2、NHE3、NHE8 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Effect of Huangqin Decoction on AQP3, AQP4, NHE2, NHE3 and NHE8 gene expressions in liver of diarrhea mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.4 黄芩汤对腹泻小鼠小肠 AQP 和 NHE83 蛋白表达的影响

如图 5 所示，免疫组化验证了 AQP3 和 NHE8 在肠道的特异性定位表达。如图 6 所示，与对照组

比较，模型组 AQP3 和 NHE8 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$)；与模型组比较，各给药组 AQP3 和 NHE8 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$)，与“2.3”项下结果一致。

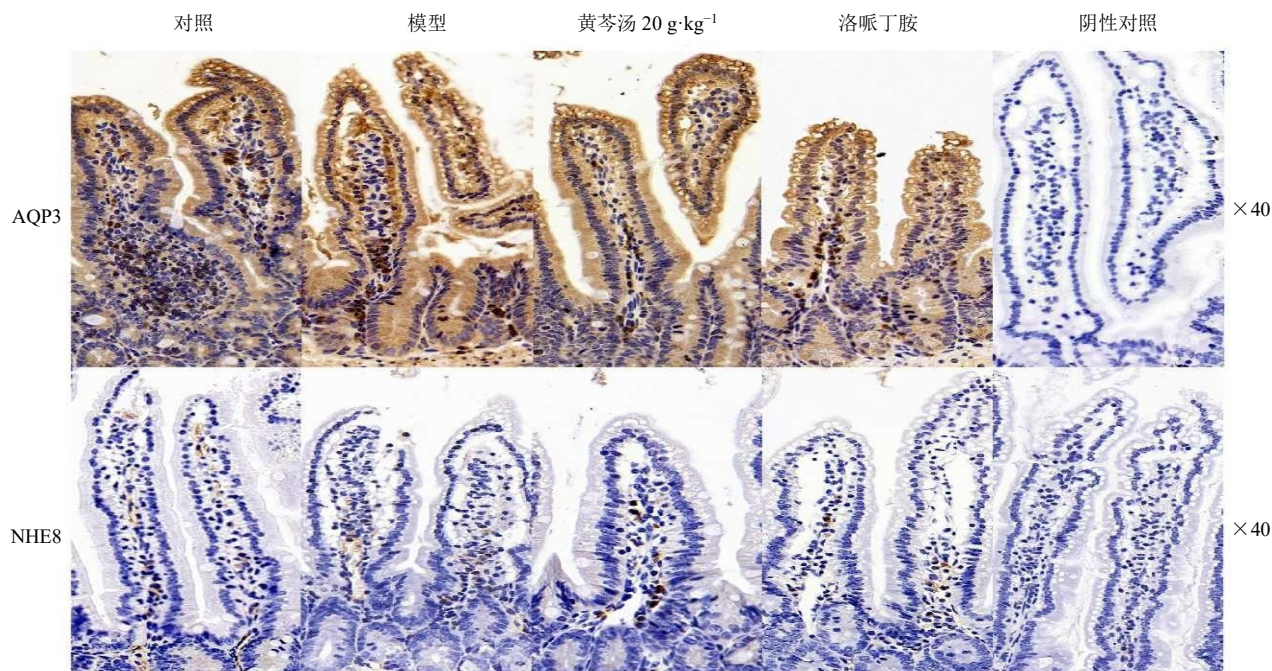
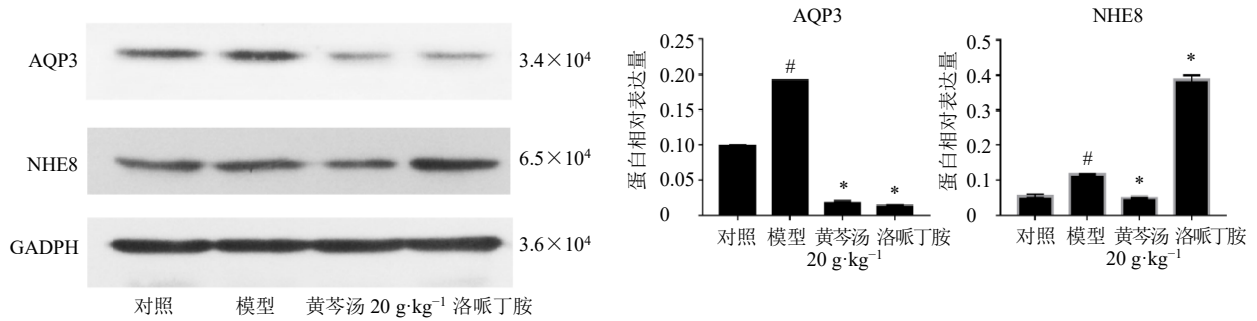


图 5 免疫组化检测 AQP3 和 NHE8 在小肠上皮细胞绒毛中的定位

Fig. 5 Localization of AQP3 (A) and NHE8 (B) in villi of small intestinal epithelial cells by immunohistochemistry

图 6 Western blotting 检测小肠 AQP3 和 NHE8 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Fig. 6 AQP3 and NHE8 protein expressions in small intestine by Western blotting ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.5 黄芩汤对腹泻小鼠肠道菌群的调节作用

采用 Shannon 指数和 ACE 指数测定肠道菌群 α 多样性 (均匀度和丰富度)。如图 7 所示, 黄芩汤低、高剂量组 Shannon 指数显著低于对照组 ($P < 0.05$)。各组 ACE 指数无显著差异。主坐标分析结果 (图 8) 显示, 黄芩汤各剂量组与模型组、对照组

差异显著, 而洛哌丁胺组与模型组相似。

如图 9-A 所示, 各组小鼠肠道菌群优势菌门为变形杆菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和厚壁菌门 (Firmicutes)。与模型组比较, 黄芩汤各剂量组和洛哌丁胺组厚壁菌门丰度降低, 黄芩汤高剂量组

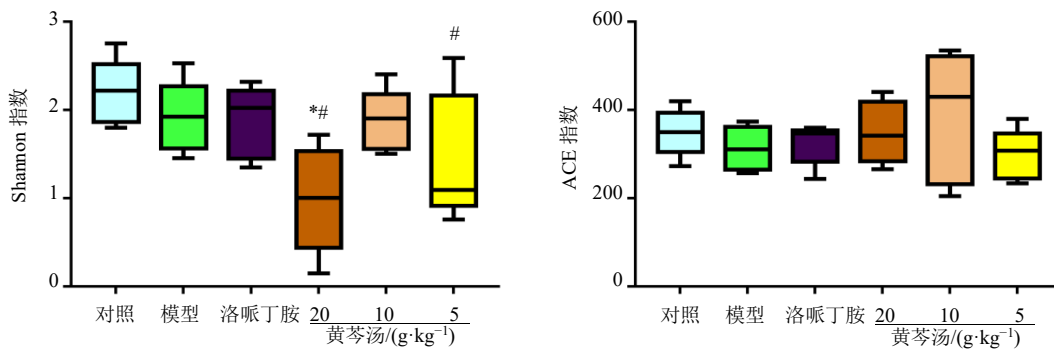
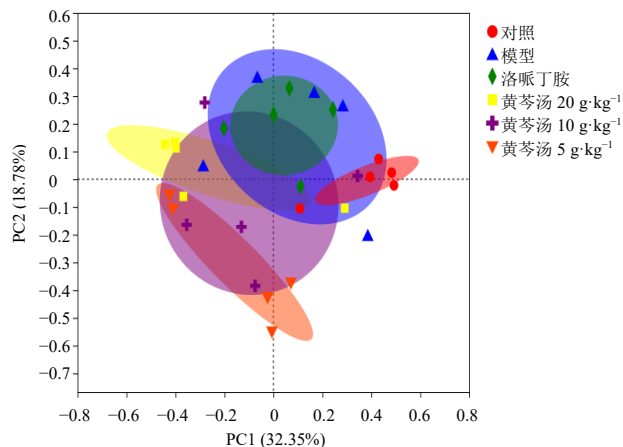
图 7 各组肠道菌群的 α 多样性 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Fig. 7 Alpha diversity of gut microbiota in each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

图 8 各组小鼠肠道菌群的主坐标分析

Fig. 8 Principal co-ordinates analysis of gut microbiota in each group of mice

和洛哌丁胺组放线菌门丰度降低, 黄芩汤中、低剂量组放线菌门丰度升高, 黄芩汤低、高剂量组和洛哌丁胺组厚壁菌门与拟杆菌门比值 (F/B) 降低。

如图 9-B 所示, 各组小鼠肠道菌群优势菌属为 *Candidatus_Arthromitus*、乳杆菌属 *Lactobacillus*、粪杆菌属 *Faecalibaculum*、棒状杆菌属 *Corynebacterium_1*、双歧杆菌属 *Bifidobacterium*、螺杆菌属 *Helicobacter* 和气球菌属 *Aerococcus*。与模型组比较, 各给药组双歧杆菌属、粪杆菌属和 *Ruminococcaceae_UCG-014* 丰度降低; 黄芩汤低剂量组 *Facklamia*、*Jeotgalicoccus* 和 *Corynebacterium_1* 丰度升高, 乳杆菌属和 *unclassified_p_Firmicutes* 丰度降低; 黄芩汤高剂量组 *unclassified_p_Firmicutes* 和 *Candidatus_Arthromitus* 丰度升高; 黄

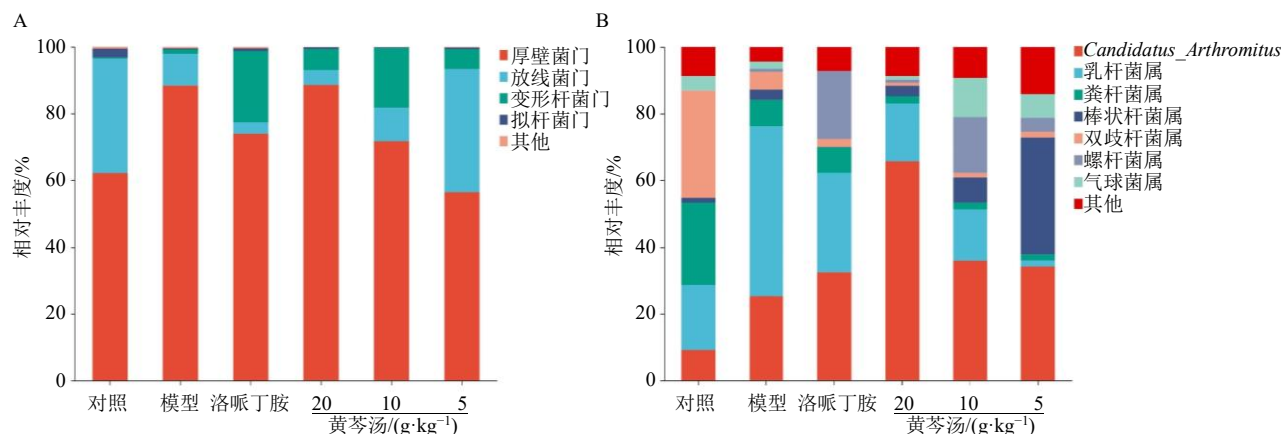


图 9 各组小鼠门 (A) 和属 (B) 水平肠道菌群丰度 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 9 Abundance of gut microbiota at phylum (A) and genus (B) levels in each group of mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

芩汤中剂量组 unclassified_p_Firmicutes 和 *Psychrobacter* 丰度升高。

4 讨论

蓖麻油及其活性成分蓖麻油酸能够降低小肠和结肠对 Na^+ 和 K^+ 的吸收,降低 Na^+ 、 K^+ ATP 酶活性,改变肠道通透性,从而引起小鼠腹泻^[32],同时会伴随肠绒毛大量坏死、脱落,杯状细胞生成量减少,随着内层黏液消耗殆尽抗菌屏障被破坏,小鼠肠道菌群稳态被破坏^[33]。蓖麻油腹泻模型模拟了小鼠在经过肠炎腹泻中的生理变化,有利于研究黄芩汤在炎症腹泻过程中药理作用研究。

本研究发现,黄芩汤可通过调节小鼠小肠内 Na^+/H^+ 交换剂和水通道蛋白来缓解小鼠腹泻。黄芩汤下调上皮细胞 *AQP3* 和 *NHE8* 的 mRNA 和蛋白表达,下调急性期蛋白 *AGPs*、*CRP* 的 mRNA 表达。与对照组比较,模型组 *AQP4* 和 *TRF* mRNA 表达水平明显降低, *NHE3* mRNA 表达水平明显升高,但黄芩汤对 *AQP4*、*TRF*、*NHE3* mRNA 表达均无明显调节作用,这可能由于腹泻诱导和组织剥离之间的时间窗太短。

通过 16S rRNA 基因测序发现,蓖麻油诱导的腹泻小鼠肠道菌群显著改变,这可能作为肠道健康的潜在生物标志物。而黄芩汤部分逆转了这一改变。厚壁菌门和拟杆菌门是主要的肠道菌群门,可以调节宿主炎症和免疫状态^[34]。厚壁菌门是宿主代谢的关键因素^[35],但其在肠道内的过度生长会导致脂多糖等代谢内毒素的产生,这些内毒素会进入血流,引发炎症^[36]。而拟杆菌门则减少了肠道和全身的炎症反应^[37-38]。因此, F/B 值升高提示自身免疫性疾病具有促炎环境和免疫失衡的特征。蓖麻油升高

F/B 值,洛哌丁胺和黄芩汤有降低 F/B 值的作用。

黄芩汤显著降低粪杆菌属的相对丰度^[39-41]。本研究结果显示,黄芩汤降低双歧杆菌属、粪杆菌属、*Ruminococcaceae_UCG-014* 和 unclassified_p_Firmicutes 的相对丰度,影响了小肠微生物群的组成。双歧杆菌是人类胃肠道的主要有益共生体^[42], *Ruminococcaceae_UCG-014* 通过分泌大量的复合酶帮助机体消化吸收纤维素的能量^[43]。在黄芩汤高剂量组中,具有调节宿主免疫系统的 *Candidatus_Arthromitus* 的相对丰度增加^[44],而在黄芩汤中、低剂量组中未发现这种现象。黄芩汤低剂量组 *Facklamia*、*Jeotgalicoccus* 和 *Corynebacterium_1* 的相对丰度增加,黄芩汤中剂量组 *Psychrobacter* 的相对丰度增加。*Jeotgalicoccus* 对人体健康有着至关重要的作用,可能是肠道菌群的核心功能群之一^[45]。*Facklamia*、*Corynebacterium_1* 和 *Psychrobacter* 在以往研究^[46-49]中均有提及,但未对其在腹泻模型中的作用进行解释。因此,这些菌群的变化与黄芩汤抗腹泻作用的关系尚不清楚。基于以上结果,推测黄芩汤可能通过降低双歧杆菌属和 *Ruminococcaceae_UCG-014* 的相对丰度,并增加 *Candidatus_Arthromitus* 和 *Jeotgalicoccus* 的相对丰度,从而平衡小鼠的肠道健康。本研究结果为腹泻的分子机制和肠道菌群的研究提供了新的思路,为黄芩汤的临床应用提供了实验依据。然而,临床腹泻的发病机制复杂,黄芩汤的作用机制需要在不同病因的腹泻模型中进行验证分析。

综上,在蓖麻油致腹泻模型中,黄芩汤具有明显的止泻作用。可以通过降低 *AQP3* 和 *NHE8* 的 mRNA 和蛋白表达,降低肠道菌群 F/B 值,来缓解

腹泻症状。本研究揭示了黄芩汤在微生态系统中的其他变化，如高剂量黄芩汤增加了 *Candidatus_Arthromitus* 的相对丰度，这与肠上皮的免疫活性有关。低剂量黄芩汤增加了 *Jeotgalicoccus* 的相对丰度，对肠道健康起着重要的作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Li S K, Cui D A, Wang S Y, *et al.* Efficacy of an herbal granule as treatment option for neonatal Tibetan lamb diarrhea under field conditions [J]. *Livest Sci*, 2015, 172: 79-84.
- [2] Yu J K, Zhang Y T, Song X, *et al.* Effect of modified *Pulsatilla* powder on enterotoxigenic *Escherichia coli* O101-induced diarrhea in mice [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 3687486.
- [3] Kaiser E A, Rea B J, Kuburas A, *et al.* Anti-CGRP antibodies block CGRP-induced diarrhea in mice [J]. *Neuropeptides*, 2017, 64: 95-99.
- [4] Urdaci M C, Lefevre M, Lafforgue G, *et al.* Antidiarrheal action of *Bacillus subtilis* CU1 CNCM I-2745 and *Lactobacillus plantarum* CNCM I-4547 in mice [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1537.
- [5] Sakai H, Sagara A, Matsumoto K, *et al.* 5-Fluorouracil induces diarrhea with changes in the expression of inflammatory cytokines and aquaporins in mouse intestines [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54788.
- [6] Masyuk A I, Marinelli R A, LaRusso N F. Water transport by epithelia of the digestive tract [J]. *Gastroenterology*, 2002, 122(2): 545-562.
- [7] Zhang D, Zhang K Q, Su W H, *et al.* Aquaporin-3 is down-regulated in jejunum villi epithelial cells during enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced diarrhea in mice [J]. *Microb Pathog*, 2017, 107: 430-435.
- [8] Zhang D, Yang L F, Su W H, *et al.* Aquaporin-4 is downregulated in the basolateral membrane of ileum epithelial cells during enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced diarrhea in mice [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2655.
- [9] Yamamoto T, Kuramoto H, Kadowaki M. Downregulation in aquaporin 4 and aquaporin 8 expression of the colon associated with the induction of allergic diarrhea in a mouse model of food allergy [J]. *Life Sci*, 2007, 81(2): 115-120.
- [10] Lei X L, Cai L, Li X, *et al.* Up-regulation of NHE8 by somatostatin ameliorates the diarrhea symptom in infectious colitis mice model [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2018, 22(3): 269-275.
- [11] Orłowski J, Grinstein S. Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family [J]. *Pflugers Arch*, 2004, 447(5): 549-565.
- [12] Schultheis P J, Clarke L L, Meneton P, *et al.* Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger [J]. *Nat Genet*, 1998, 19(3): 282-285.
- [13] Putney L K, Denker S P, Barber D L. The changing face of the Na⁺/H⁺ exchanger, NHE1: Structure, regulation, and cellular actions [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2002, 42: 527-552.
- [14] Saksena S, Theegala S, Bansal N, *et al.* Mechanisms underlying modulation of monocarboxylate transporter 1 (MCT1) by somatostatin in human intestinal epithelial cells [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009, 297(5): G878-G885.
- [15] Fiori M, Gras E G, Amorena C. Decreased NHE8 isoform expression and defective acidification in proximal convoluted tubules of senile rats [J]. *Age*, 2009, 31(1): 77-84.
- [16] Wang A P, Li J, Zhao Y, *et al.* Loss of NHE8 expression impairs intestinal mucosal integrity [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2015, 309(11): G855-G864.
- [17] Zachos N C, Tse M, Donowitz M. Molecular physiology of intestinal Na⁺/H⁺ exchange [J]. *Annu Rev Physiol*, 2005, 67: 411-443.
- [18] Ceciliani F, Ceron J J, Eckersall P D, *et al.* Acute phase proteins in ruminants [J]. *J Proteomics*, 2012, 75(14): 4207-4231.
- [19] Jain S, Gautam V, Naseem S. Acute-phase proteins: As diagnostic tool [J]. *J Pharm Bioallied Sci*, 2011, 3(1): 118-127.
- [20] Mousa W K, Athar B, Merwin N J, *et al.* Antibiotics and specialized metabolites from the human microbiota [J]. *Nat Prod Rep*, 2017, 34(11): 1302-1331.
- [21] Joyner P M, Liu J M, Zhang Z J, *et al.* Mutanobactin A from the human oral pathogen *Streptococcus mutans* is a cross-Kingdom regulator of the yeast-mycelium transition [J]. *Org Biomol Chem*, 2010, 8(24): 5486-5489.
- [22] Hillman J D, Novák J, Sagura E, *et al.* Genetic and biochemical analysis of mutacin 1140, a lantibiotic from *Streptococcus mutans* [J]. *Infect Immun*, 1998, 66(6): 2743-2749.
- [23] Wescombe P A, Upton M, Dierksen K P, *et al.* Production of the lantibiotic salivaricin A and its variants by oral streptococci and use of a specific induction assay to detect their presence in human saliva [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(2): 1459-1466.
- [24] Barbour A, Philip K, Muniandy S. Enhanced production, purification, characterization and mechanism of action of salivaricin 9 lantibiotic produced by *Streptococcus salivarius* NU10 [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77751.
- [25] Birri D J, Brede D A, Nes I F. Salivaricin D, a novel

- intrinsically trypsin-resistant lantibiotic from *Streptococcus salivarius* 5M6c isolated from a healthy infant [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(2): 402-410.
- [26] He X S, McLean J S, Guo L H, *et al.* The social structure of microbial community involved in colonization resistance [J]. *ISME J*, 2014, 8(3): 564-574.
- [27] Lam W, Bussom S, Guan F L, *et al.* The four-herb Chinese medicine PHY906 reduces chemotherapy-induced gastrointestinal toxicity [J]. *Sci Transl Med*, 2010, 2(45): 45ra59.
- [28] Lam W, Jiang Z L, Guan F L, *et al.* The number of intestinal bacteria is not critical for the enhancement of antitumor activity and reduction of intestinal toxicity of irinotecan by the Chinese herbal medicine PHY906 (KD018) [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14: 490.
- [29] 马旭冉, 王敦方, 冯雪, 等. 基于 Wnt 信号通路研究黄芩汤干预炎症微环境下结肠癌细胞上皮间质转化与细胞周期进程的作用机制 [J]. *中草药*, 2023, 54(7): 2155-2162.
- [30] Cheng Y C, Liu S H, Tilton R. Use of PHY906 as treatment for inflammatory bowel disease and/or irritable bowel syndrome: USA, US10058581 [P]. 2018-08-28.
- [31] Liu S H, Jiang Z L, Cheng Y C. Herbal composition PHY906 and its use in chemotherapy: US11324793 [P]. 2022-05-10.
- [32] Shoba F G, Thomas M. Study of antidiarrhoeal activity of four medicinal plants in castor-oil induced diarrhoea [J]. *J Ethnopharmacol*, 2001, 76(1): 73-76.
- [33] 周后敏, 赵玥, 王洋, 等. 蓖麻油致小鼠腹泻模型的建立及评价 [A] // 中国畜牧兽医学会兽医病理学分会第二十四次学术研讨会、中国病理生理学会动物病理生理专业委员会第二十三次学术研讨会、中国实验动物学会实验病理专业委员会第三次学术研讨会、中国兽医病理学家第三次学术研讨会论文集 [C]. 青岛: 中国畜牧兽医学会兽医病理学分会, 2018: 172.
- [34] Chang C J, Lin C S, Lu C C, *et al.* *Ganoderma lucidum* reduces obesity in mice by modulating the composition of the gut microbiota [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7489.
- [35] Ley R E, Lozupone C A, Hamady M, *et al.* Worlds within worlds: Evolution of the vertebrate gut microbiota [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6(10): 776-788.
- [36] Poppleton D I, Duchateau M, Hourdel V, *et al.* Outer membrane proteome of *Veillonella parvula*: A diderm firmicute of the human microbiome [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 1215.
- [37] Ley R E, Turnbaugh P J, Klein S, *et al.* Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity [J]. *Nature*, 2006, 444(7122): 1022-1023.
- [38] Ley R E, Bäckhed F, Turnbaugh P, *et al.* Obesity alters gut microbial ecology [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(31): 11070-11075.
- [39] Li J W, Fang B, Pang G F, *et al.* Age- and diet-specific effects of chronic exposure to chlorpyrifos on hormones, inflammation and gut microbiota in rats [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2019, 159: 68-79.
- [40] Ma H, Zhang B W, Hu Y Z, *et al.* Correlation analysis of intestinal redox state with the gut microbiota reveals the positive intervention of tea polyphenols on hyperlipidemia in high fat diet fed mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(26): 7325-7335.
- [41] Bai Y F, Wang S W, Wang X X, *et al.* The flavonoid-rich Quzhou Fructus Aurantii extract modulates gut microbiota and prevents obesity in high-fat diet-fed mice [J]. *Nutr Diabetes*, 2019, 9(1): 30.
- [42] Zhang J C, Guo Z, Xue Z S, *et al.* A phylo-functional core of gut microbiota in healthy young Chinese cohorts across lifestyles, geography and ethnicities [J]. *ISME J*, 2015, 9(9): 1979-1990.
- [43] Wang Y J, Jiang M Y, Zhang Z Y, *et al.* Effects of over-load iron on nutrient digestibility, haemato-biochemistry, rumen fermentation and bacterial communities in sheep [J]. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 2020, 104(1): 32-43.
- [44] Thompson C L, Mikaelian A, Brune A. Immune-modulating gut symbionts are not *Candidatus Arthromitus* [J]. *Mucosal Immunol*, 2013, 6(1): 200-201.
- [45] Cheng S F, Mao H R, Ruan Y Z, *et al.* Copper changes intestinal microbiota of the cecum and rectum in female mice by 16S rRNA gene sequencing [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2020, 193(2): 445-455.
- [46] Timsit E, Workentine M, van der Meer F, *et al.* Distinct bacterial metacommunities inhabit the upper and lower respiratory tracts of healthy feedlot cattle and those diagnosed with bronchopneumonia [J]. *Vet Microbiol*, 2018, 221: 105-113.
- [47] Chen H C, Chai T J. Microflora of drainage from ice in fishing vessel fishholds [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1982, 43(6): 1360-1365.
- [48] Bi Y L, Zeng S Q, Zhang R, *et al.* Effects of dietary energy levels on rumen bacterial community composition in Holstein heifers under the same forage to concentrate ratio condition [J]. *BMC Microbiol*, 2018, 18(1): 69.
- [49] Sakandar H A, Huang W, Kubow S, *et al.* Comparison of bacterial communities in gliadin-degraded sourdough (Khamir) sample and non-degraded sample [J]. *J Food Sci Technol*, 2020, 57(1): 375-380.

[责任编辑 李亚楠]