六神曲多糖提取工艺优化及其抗溃疡性结肠炎作用研究

栗嘉淇[1]， 尹 磊[2]， 郑 威[1]， 宋孟霜[1]， 张 希[1]， 孔 兵[1]， 许 枏[1*]
(1. 辽宁中医药大学药学院，辽宁 大连 116600；2. 安徽普仁中药饮片有限公司，安徽 亳州 236800)

摘要：目的 优化六神曲多糖提取工艺，并探讨其抗溃疡性结肠炎作用。**方法** 以乙醇体积分数、醇提时间、液料比、水提时间为影响因素，多糖得率为评价指标，Box-Behnken 响应面法优化提取工艺。采用 2% 葡聚糖硫酸钠（DSS）制备溃疡性结肠炎小鼠模型，检测体质量、粪便性状、粪便隐血情况，计算疾病活动指数（DAI），并结合结肠长度、结肠组织病理变化及脾脏 $CD4^+$、$CD8^+$、Treg 细胞比例考察多糖的肠道保护作用。**结果** 最佳条件为乙醇体积分数 78%，醇提时间 2 h，液料比 44∶1，水提时间 2 h，多糖得率为 18.457%。与模型组比较，六神曲多糖组小鼠体质量增加（$P<0.01$），DAI 评分及 $CD4^+/CD8^+$、$CD4^+Foxp3^+$Treg 升高（$P<0.01$），结肠长度增长（$P<0.01$），结肠黏膜受损较轻，腺体排列基本规则，杯状细胞较多，炎症细胞浸润较少。**结论** 该方法稳定可靠，可用于提取抗溃疡性结肠炎作用较强的六神曲多糖。

关键词：六神曲多糖；提取工艺；抗溃疡性结肠炎作用；Box-Behnken 响应面法
中图分类号：R284.2 **文献标志码**：B **文章编号**：1001-1528(2024)01-0232-06
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2024.01.040

六神曲作为常用健脾中药，是神曲消食口服液、小儿至宝丸等制剂的主要组成，虽然其活性物质与作用机理目前尚不明确，但一些研究已证实六神曲具有良好的肠道保护作用[1-3]。前期报道，以六神曲为食物添加剂时，可缓解仔猪断乳应激，改善肠道菌群，提高肠内容物中短链脂肪酸含量与血浆抗氧化能力，降低肠黏膜炎症因子水平，而且副作用比抗生素更小[4]；可通过减少结肠黏膜中致病性鞭毛细菌及其鞭毛蛋白含量，抑制特异性受体 TLR5 蛋白表达，减少内脏过敏[5]，还具有抑制 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞产生 NO、TNF-α 等炎症因子分泌作用[6]。

成分研究显示，六神曲活性与发酵有关[7-8]。Fu[9] 等发现，在发酵第 7 天六神曲成分与原料成分的相似度仅为 0.106，苦杏仁苷、芦丁等成分被降解，提示发酵是其产生活性物质的重要过程。课题组前期研究发现，六神曲发酵前后多糖类成分发生显著变化，其中水溶性多糖含量增加 20% 以上[10]。为了揭示六神曲多糖活性，本实验优化该成分提取工艺，并采用 DSS 诱导溃疡性结肠炎小鼠模型探索其肠道保护作用。

1 材料

1.1 仪器 Fresco 台式冷冻离心机，购自德国 Heraeus 公司；BDplus6 流式细胞仪，购自美国 BD Biosciences 公司；Milli-Q IQ 7000 纯水仪，购自德国默克公司；U-3010 紫外-可见分光光度计，购自日本日立公司；电子天平（十万分之一），购自德国赛多利斯公司；DHG-9053A 电热恒温鼓风干燥箱，购自上海申贤恒温设备厂；HH-4 数显恒温水浴锅，购自常州国华电器有限公司；UX4200S 电子天平，购自上海衡发实业有限公司；ECLIPSE Ts2-FL 倒置生物显微镜，购自日本 Nikon 公司。

1.2 试剂与药物 蒽酮、联邻甲苯胺（上海阿拉丁生化材料股份有限公司，批号 K2202111、T818491）；葡聚糖硫酸钠（美国 MP Biomedicals 公司，批号 S7102）。柳氮磺吡啶肠溶片（上海信谊天平药业有限公司，批号 09220302）。APC Rat Anti-mice CD4、PE Rat Anti-mice CD8a、PE Rat Anti-mice Foxp3、4×Fix/Perm Buffer、Diluent Buffer、5×Perm/Wash Buffer（美国 BD 公司，批号 553051、553030、563101、562574、562574、562574）；1×PBS（索莱宝生物科技有限公司，批号 20210927）。红细胞裂解液［批号 abs9101，爱必信（上海）生物科技有限公司］。六神曲、面粉、苦杏仁、赤小豆、辣蓼、青蒿、苍耳草、麦麸（安徽普仁中药饮片有限公司，批号 2112052），经安徽普仁饮片有限公司尹磊工程师鉴定为正品，标本保存于安徽普仁饮片有限公司。无水葡萄糖、无水乙醇、浓硫酸、乙醚（天津市科密欧化学试剂有限公司）。

1.3 动物 SPF 级健康雄性 C57BL/6 小鼠，6~8 周龄，体质量 18~22 g，购自辽宁长生生物科技股份有限公司，动物生产许可证号 SCXK（辽）2020-0001，饲养于辽宁中医

收稿日期：2023-08-10
基金项目：国家自然科学基金项目（82074013）；辽宁省教育厅项目（LJKMZ20221319）
作者简介：栗嘉淇（1999—），男，硕士生，研究方向为中药活性物质的分离和提取。Tel：（0411）85890191，E-mail：1282109517@qq.com
*通信作者：许 枏（1968—），女，博士，教授，研究方向为中药活性物质及其质量。Tel：（0411）85890191，E-mail：xudanbs@163.com

药大学大连校区实验动物中心 SPF 级动物房。动物实验经辽宁中医药大学实验动物伦理委员会批准（伦理批件号 2020041）。

2 方法与结果

2.1 多糖含量测定

2.1.1 供试品溶液制备 精密称取六神曲粉末 0.5 g，置于圆底烧瓶中，加 80% 乙醇 20 mL，加热回流提取 2 h，趁热过滤，弃滤液，药渣加 50 mL 水，加热回流提取 2 h，趁热过滤，精密吸取续滤液 3 mL，置于 50 mL 量瓶中，加水至刻度，摇匀，即得。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取 105 ℃干燥至恒重的无水葡萄糖对照品 25 mg，置于 100 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀，即得。

2.1.3 最大吸收波长确定 精密吸取供试品溶液 1 mL、对照品溶液 0.5 mL，置于 10 mL 具塞刻度试管中，加水至 1.0 mL，摇匀，缓慢滴加 0.2% 蒽酮-硫酸溶液 5 mL，摇匀，迅速置于沸水浴中加热 10 min，取出，立即置于冰水浴中冷却 10 min，取出，以相应试剂为空白，在 400~800 nm 波长范围内扫描吸收曲线。最终确定，最大吸收波长为 638 nm。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL，各 3 份，按“2.1.3”项下方法处理，在 638 nm 波长处测定吸光度。以对照品进样量为横坐标（X），吸光度为纵坐标（A）进行回归，得方程为 $A=5.834\ 3X-0.015\ 7$（$r=0.999\ 15$），在 0.025 4~0.127 0 mg 范围内线性关系良好。

2.1.5 多糖得率测定 按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液，精密量取 1 mL，平行 3 份，置于 10 mL 具塞刻度试管中，按“2.1.3”项下方法处理，在 638 nm 波长处测定吸光度，计算多糖得率，公式为得率=$\frac{C\times V\times N}{M\times 1\ 000}\times 100\%$，其中 C 为多糖含量，V 为供试品溶液体积，N 为稀释倍数，M 为六神曲粉末质量。

2.2 方法学考察

2.2.1 精密度试验 精密量取供试品溶液 1.0 mL，置于 10 mL 具塞试管中，按“2.1.3”项下方法处理，在 638 nm 波长处测定吸光度 6 次，测得其 RSD 为 0.32%，表明仪器精密度良好。

2.2.2 重复性试验 按“2.1.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，分别精密量取 1.0 mL，置于 10 mL 具塞试管中，按“2.1.3”项下方法处理，在 638 nm 波长处测定吸光度，测得多糖含量 RSD 为 1.84%，表明该方法重复性良好。

2.2.3 稳定性试验 精密量取供试品溶液 1 mL，置于 10 mL 具塞试管中，按“2.1.3”项下方法处理，于 2、4、8、12、24 h 在 638 nm 波长处测定吸光度，测得多糖含量 RSD 为 1.26%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.4 加样回收率试验 精密量取 9 份多糖含量已知的六神曲粉末，加入一定量对照品，按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液，分别精密量取 1 mL，置于 10 mL 具塞试管中，按“2.1.3”项下方法处理，在 638 nm 波长处测定吸光度，计算回收率。结果，平均加样回收率为 98.29%，RSD 为 1.54%。

2.3 提取工艺优化 采用 Box-Behnken 响应面法。根据预实验结果，确定初始提取工艺为六神曲细粉加一定体积分数乙醇提取，弃取醇提液，药渣加水煎煮，过滤，取上清液，加入乙醇充分搅拌，使含醇量达 80%，室温静置 24 h，离心，收集沉淀，冷冻干燥。

在单因素试验基础上，以乙醇体积分数（A）、醇提时间（B）、液料比（C）、水提时间（D）为影响因素，多糖得率（Y）为评价指标，优化提取工艺，因素水平见表 1，结果见表 2。

表 1 因素水平

水平	因素			
	A 乙醇体积分数/%	B 醇提时间/h	C 液料比	D 水提时间/h
−1	70	1.5	30∶1	1.5
0	80	2	40∶1	2
1	90	2.5	50∶1	2.5

表 2 Box-Behnken 响应面法设计与结果

试验号	因素				Y 多糖得率/%
	A 乙醇体积分数/%	B 醇提时间/h	C 液料比	D 水提时间/h	
1	70	1.5	40∶1	2	14.50
2	70	2.5	40∶1	2	16.14
3	90	1.5	40∶1	2	13.17
4	90	2.5	40∶1	2	10.88
5	80	2	30∶1	1.5	12.34
6	80	2	50∶1	1.5	12.74
7	80	2	30∶1	2.5	12.49
8	80	2	50∶1	2.5	17.22
9	80	1.5	40∶1	1.5	13.04
10	80	2.5	40∶1	1.5	12.28
11	80	1.5	40∶1	2.5	14.74
12	80	2.5	40∶1	2.5	15.52
13	70	2	30∶1	2	14.08
14	90	2	30∶1	2	10.27
15	70	2	50∶1	2	16.63
16	90	2	50∶1	2	14.53
17	80	1.5	30∶1	2	10.54
18	80	2.5	30∶1	2	13.42
19	80	1.5	50∶1	2	15.77
20	80	2.5	50∶1	2	14.68
21	70	2	40∶1	1.5	16.52
22	90	2	40∶1	1.5	9.72
23	70	2	40∶1	2.5	13.78
24	90	2	40∶1	2.5	14.71
25	80	2	40∶1	2	17.45
26	80	2	40∶1	2	17.93
27	80	2	40∶1	2	18.26
28	80	2	40∶1	2	18.55
29	80	2	40∶1	2	18.89

通过 Design-Expert 13.0 软件对表 2 数据进行拟合，得方程为 $Y = 18.22 - 1.53A + 0.096\ 7B + 1.54C + 0.985\ 0D - 0.982\ 5AB + 0.427\ 5AC + 1.93AD - 0.992\ 5BC + 0.385\ 0BD + 1.08CD - 2.23A^2 - 2.26B^2 - 2.26C^2 - 2.21D^2$，方差分析见表 3，可行性研究结果见表 4。

表 3 方差分析结果

来源	离均差平方和	自由度	均方	*F* 值	*P* 值
模型	179.93	14	12.85	46.55	<0.000 1
A	28.12	1	28.12	101.86	<0.000 1
B	0.112 1	1	0.112 1	0.406 2	0.534 2
C	28.31	1	28.31	102.53	<0.000 1
D	11.64	1	11.64	42.17	<0.000 1
AB	3.86	1	3.86	13.99	0.002 2
AC	0.731	1	0.731	2.65	0.126 0
AD	14.94	1	14.94	54.11	<0.000 1
BC	3.94	1	3.94	14.27	0.002 0
BD	0.592 9	1	0.592 9	2.15	0.164 9
CD	4.69	1	4.69	16.98	0.001 0
A^2	32.25	1	32.25	116.81	<0.000 1
B^2	33.16	1	33.16	120.10	<0.000 1
C^2	33.05	1	33.05	119.71	<0.000 1
D^2	31.64	1	31.64	114.59	<0.000 1
残差	3.86	14	0.276 1	—	—
失拟项	2.63	10	0.262 9	0.850 5	0.621 7
纯误差	1.24	4	0.309 1	—	—
所有项	183.79	28	—	—	—

表 4 可行性研究结果

项目	数值	项目	数值	项目	数值
标准差	0.525 4	变异系数	3.62	Adj R^2	0.957 9
平均值	14.51	R^2	0.979 0	信噪比	23.516 4

由表 3 可知，模型 $P<0.01$，具有高度显著性；失拟项 $P>0.05$，表明未知因素对实验结果影响较小；各因素及其交互项、二次项均有显著或极显著影响（$P<0.05$，$P<0.01$）。由表 4 可知，决定系数 R^2、调整决定系数 Adj R^2 均大于 0.95，表明模型拟合度较高，可替代真实点进行分析优化。

响应面分析见图 1。由此可知，各因素对多糖得率的影响均呈抛物线形；*AC*、*AD*、*BC*、*BD* 交互的等高线中心呈椭圆形，表明上述两两因素交互作用有显著影响；各因素影响程度依次为 *C*>*A*>*D*>*B*。

最终确定，最优提取工艺为乙醇体积分数 77.878%，醇提时间 2.003 h，液料比 43.729∶1，水提时间 2.111 h，多糖得率为 18.774%，为了便于实验操作，将其修正为乙醇体积分数 78%，醇提时间 2 h，液料比 44∶1，水提时间 2 h。按上述优化工艺进行 3 批验证试验，测得多糖得率分别为 18.424%、18.826%、18.121%，平均值为 18.457%，与预测值 18.774% 接近，表明模型稳定性良好，并且所得提取液经冷冻干燥后为白色粉末。

2.4 抗溃疡性结肠炎作用研究

2.4.1 药液制备

2.4.1.1 多糖 取按“2.3”项下优化工艺制备的多糖适量，加水制成 0.18 g/mL 溶液，即得（含六神曲生药量为 1 g/mL）。

2.4.1.2 阳性药 取柳氮磺胺吡啶肠溶片适量，研成细粉，加水制成混悬液（40 mg/mL），即得。

2.4.1.3 模型 称取 DSS 适量，加蒸馏水制成浓度为 2%，振摇，溶解，即得。

2.4.2 分组、造模与给药 60 只小鼠适应性饲养 1 周后，随机分为空白组、模型组、阳性药组（400 mg/kg）、六神曲多糖组（1.8 g/kg，折合临床剂量的 6 倍），每组 15 只，通过自由饮用“2.4.1.3”项下药液来制备慢性溃疡性结肠炎模型。空白组小鼠全程饮用蒸馏水，其余各组小鼠前 5 d 饮用含 2% DSS 的蒸馏水，第 6~10 天改饮蒸馏水，每 10 d 为 1 个周期，在第 3 个周期的第 7 天实验结束。实验期间，阳性药组、六神曲多糖组小鼠每天分别灌胃给予相应剂量药物，空白组、模型组小鼠灌胃给予等体积蒸馏水。末次给药后，小鼠禁食 12 h，麻醉处死，采集组织样本，记录结肠长度，检测相应生化指标。采用 SPSS 25.0 软件对数据进行统计，结果以（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较采用单因素方差分析（ANOVA）结合 *t* 检验，$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义，并采用 GraphPad Prism 8.0 软件绘图。

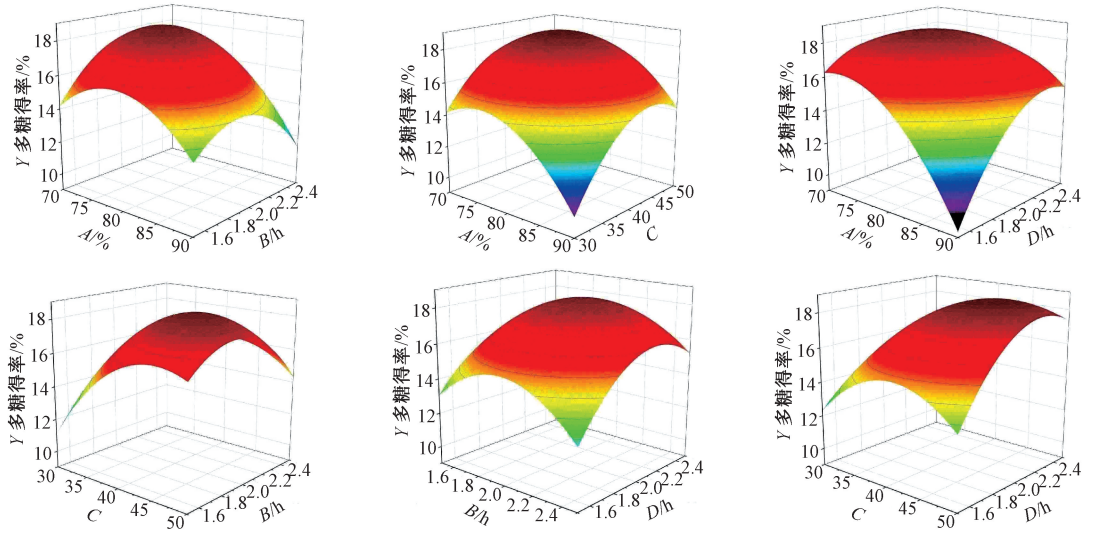
2.4.3 体质量、疾病活动指数（DAI）评分 每天记录各组小鼠体质量、粪便性状，每 2 d 分析 1 次粪便隐血情况[11]，计算 DAI 评分[12]，公式为 DAI 评分=（体质量变化评分+粪便性状评分+便血评分）/3，其中体质量变化率=[（测定时体质量−初始体质量）/初始体质量]×100%，标准见表 5。

表 5 DAI 评分标准

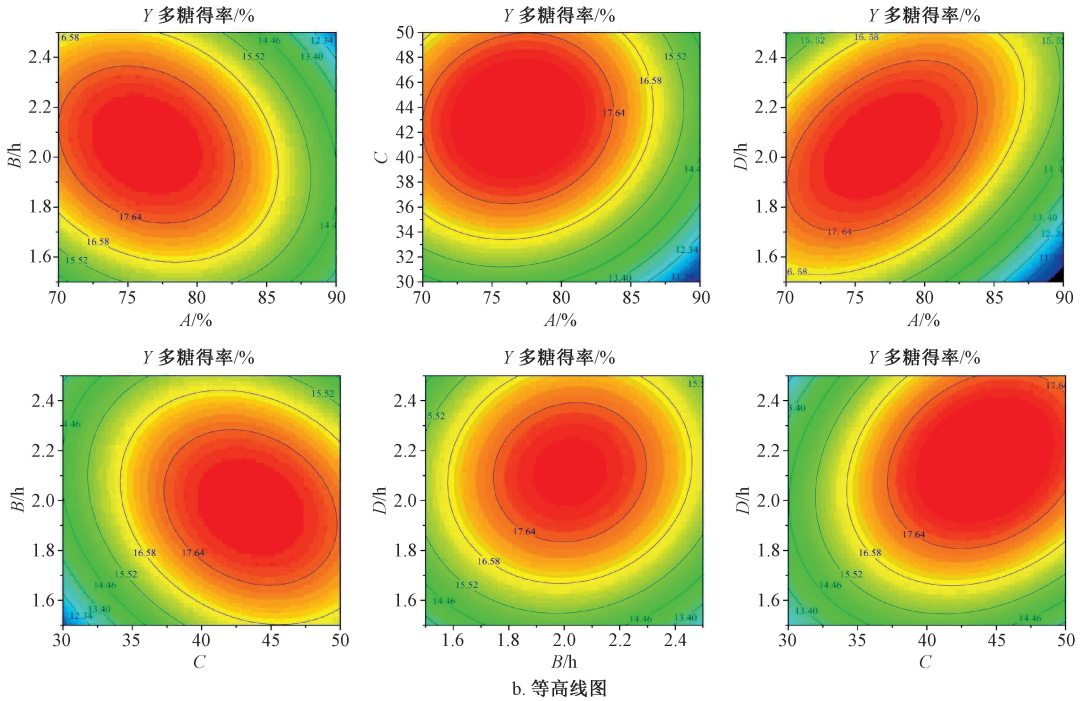
体质量变化	粪便性状	粪便隐血	评分/分
≤1%	正常	隐血阴性（>3 min）	0
下降 1%~5%	粪粒变小，性状正常	隐血阳性（1~2 min）	1
下降 5%~10%	松软	隐血阳性（30 s~1 min）	2
下降 10%~15%	轻微稀便	肉眼血便（10~30 s）	3
下降 15% 以上	稀便	肉眼血便（<10 s）	4

造模第 4 天开始，模型组小鼠粪便开始出现隐血，第 7 天时开始出现肉眼血便；造模 7 d 后，阳性药组、六神曲多糖组小鼠粪便才开始出现粪便隐血。图 2A 显示，实验结束时空白组小鼠体质量平均增加 17.97%；模型组小鼠体质量平均下降 18.24%；阳性药组、六神曲多糖组小鼠体质量变化趋势基本一致，并且其下降率均低于模型组（$P<0.05$，$P<0.01$）。图 2B 显示，与空白组比较，模型组小鼠 DAI 评分升高（$P<0.01$）；与模型组比较，六神曲多糖组小鼠 DAI 评分降低（$P<0.01$）。

2.4.4 结肠组织形态学 各组小鼠麻醉处死后剪开腹腔，分离结肠，测定长度，再剪取 1 cm 左右远端结肠，PBS 缓冲液冲洗后用 4% 多聚甲醛固定，30% 蔗糖溶液脱水，OCT 包埋（−80 ℃），切片，HE 染色，显微镜下观察组织形态，结果见图 3A。由此可知，空白组小鼠结肠黏膜完整，



a. 三维曲面图



b. 等高线图

注：$A\sim D$ 分别为乙醇体积分数、醇提时间、液料比、水提时间。

图 1 各因素响应面图

腺体结构排列规则，上皮细胞排列紧密，杯状细胞丰富，无炎症细胞浸润；模型组小鼠结肠组织结构紊乱，结肠黏膜严重损伤，隐窝与杯状细胞大量消失，伴有大量炎症细胞浸润；六神曲多糖组、阳性药组小鼠结肠黏膜受损较轻，腺体排列基本规则，杯状细胞较多，炎症细胞浸润较少。

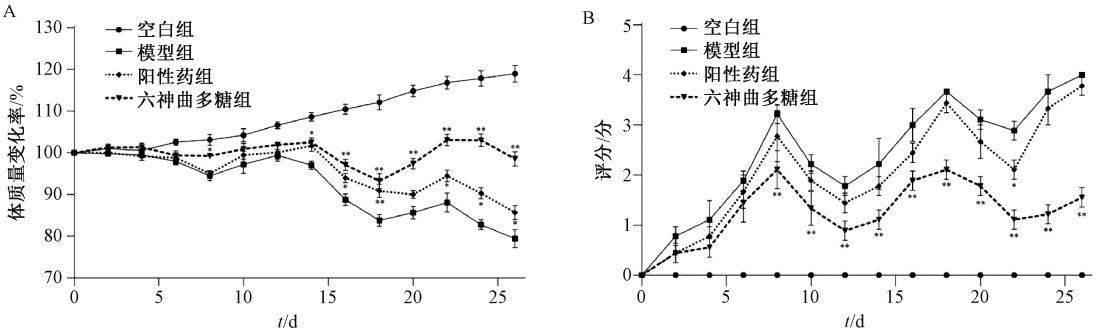
结肠长度见图 3B、表 6。由此可知，与空白组比较，模型组小鼠结肠长度缩短（$P<0.01$）；与模型组比较，阳性药组、六神曲多糖组小鼠结肠长度增长（$P<0.05$，$P<0.01$），以后者更明显。

2.4.5 脾脏 $CD4^+/CD8^+$、$CD4^+Foxp3^+$Treg 水平 采用机械研磨法将小鼠脾脏制成脾细胞悬液，经离心、重悬、加入 Ficoll 试液分层后取淋巴细胞，过细胞筛，计数，抗体孵育、洗涤，加入核内荧光抗体，涡旋，在 4 ℃下孵育 40 min，PBS 缓冲液洗涤，过筛后采用 flowjo 软件（10.0 版本）上机检测，结果见图 4。由此可知，与空白组比较，模型组小鼠脾脏 $CD4^+/CD8^+$、$CD4^+$ Fopx3$^+$ Treg 水平降低

表 6 各组小鼠结肠长度比较（$\bar{x}\pm s$，$n=15$）

组别	结肠长度/cm
空白组	7.30±0.15
模型组	4.97±0.49$^{\#\#}$
阳性药组	5.90±0.49$^{\#\#*}$
六神曲多糖组	6.67±0.59**

注：与空白组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。



注：与空白组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

图 2 各组小鼠体质量、DAI 评分比较

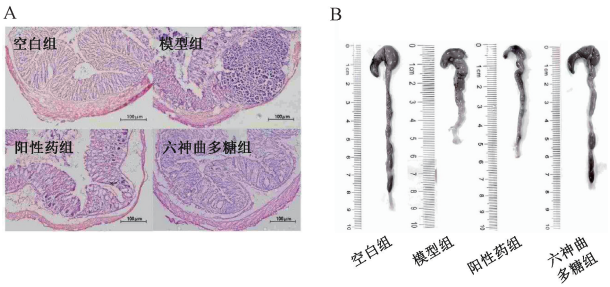
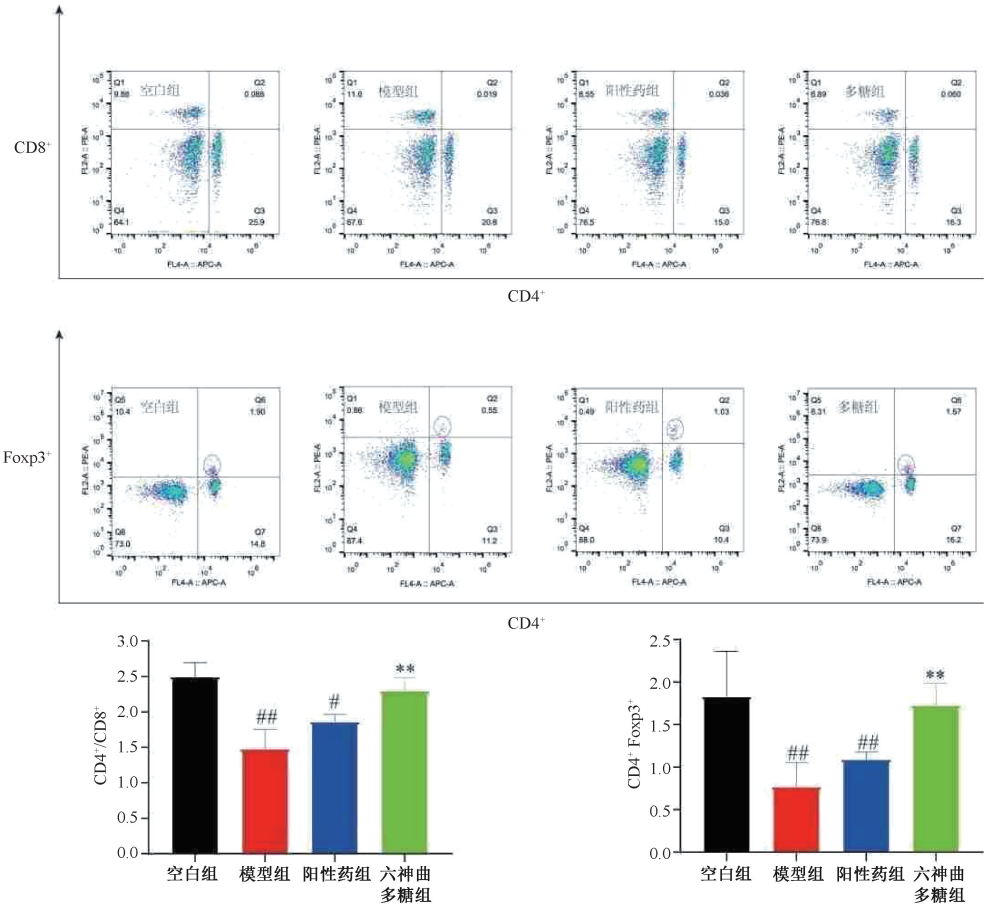


图 3 各组小鼠结肠组织病理变化及结肠长度（HE×100）

（$P<0.01$）；与模型组比较，六神曲多糖组小鼠脾脏两者升高（$P<0.01$），但阳性药组无明显变化（$P>0.05$）。

3 讨论

在六神曲传统发酵过程中，有细菌、曲霉、酵母菌等多种微生物参与[13]，除主料面粉中的淀粉经淀粉酶、纤维素酶降解产生次生多糖外[14]，麦麸中阿魏酰阿拉伯木聚糖[15]、酵母细胞壁中甘露聚糖均是六神曲多糖来源[16]，可能是六神曲中多糖含量较高的主要原因，但鲜有关于该



注：与空白组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{**}P<0.01$。

图 4 各组小鼠脾脏 $CD4^+/CD8^+$、$CD4^+Foxp3^+$Treg 水平比较

成分活性及其结构的报道。本实验在单因素试验基础上，采用 Box-Behnken 响应面法优化六神曲多糖提取工艺，测得其得率为 18.457%，与预测值 18.774% 接近，表明工艺准确可靠，可为后续该成分活性、构效关系研究奠定基础。

多糖类成分不能被肠道直接吸收，往往是被结肠内微生物降解，产生短链脂肪酸或通过抗原提呈来参与 T 细胞免疫调节[17]，从而改善肠道菌群，提高肠道免疫[18]，改善肠道健康。本实验发现，六神曲多糖能有效抑制溃疡性结肠炎小鼠结肠变短、体质量降低、疾病指数增加，提示该成分具有一定的保护肠道作用。

CD4 为 T 辅助细胞，CD8 为 T 杀伤细胞，两者相互平衡从而发挥维护肠道正常免疫功能[19]。溃疡性结肠炎属于免疫性疾病，患者结肠黏膜 T 淋巴细胞亚群变化以 $CD8^+$ 细胞水平升高、$CD4^+/CD8^+$ 下降为主[20]，同时 Treg 细胞数降低[21]。本实验发现，慢性结肠炎小鼠给予六神曲多糖后 $CD4^+/CD8^+$ 升高，接近空白组；Treg 细胞核内转录因子 $Foxp3^+$ 水平升高，表明其数量出现回调，提示该成分对溃疡性结肠炎的抑制作用可能与调节肠道免疫有关。

参考文献：

[1] Bose S, Song M Y, Nam J K, *et al*. *In vitro* and *in vivo* protective effects of fermented preparations of dietary herbs against lipopolysaccharide insult[J]. *Food Chem*, 2012, 134(2): 758-765.

[2] 高鹏飞，张文意，周蓉蓉，等. 神曲对小鼠消化功能的影响[J]. 中华中医药学刊，2016，34(2)：362-364.

[3] 张露蓉，江国荣，王 斐，等. 六神曲生品与炒制品的消化酶活力及胃肠动力比较[J]. 中国临床药学杂志，2011，20(3)：148-150.

[4] Wang Y B, Xie Q H, Sun S, *et al*. Probiotics-fermented *Massa Medicata Fermentata* ameliorates weaning stress in piglets related to improving intestinal homeostasis [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(24): 10713-10727.

[5] Zhuang Z M, Huang C, Zhang Y G, *et al*. Effects of *Massa Medicata Fermentata* on the intestinal pathogenic flagella bacteria and visceral hypersensitivity in rats with irritable bowel syndrome[J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 1039804.

[6] Liu Y, Liu W Q, Fan S Q, *et al*. Processing mechanism of *Massa Medicata Fermentata* based on the correlation analysis of strains, chemical compositions and anti-inflammatory activity [J]. *Chem Biodivers*, 2023, 20(1): e202200822.

[7] Bai Y L, Zheng M S, Fu R, *et al*. Effect of *Massa Medicata Fermentata* on the intestinal flora of rats with functional dyspepsia[J]. *Microb Pathogenesis*, 2023, 174: 105927.

[8] Zhang X R, Zhang H L, Huang Q W, *et al*. Effect of *Massa Medicata Fermentata* on the gut microbiota of dyspepsia mice based on 16S rRNA technique [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 7643528.

[9] Fu F Q, Xu M S, Wei Z J, *et al*. Biostudy on traditional Chinese medicine *Massa Medicata Fermentata*[J]. *ACS Omega*, 2020, 5(19): 10987-10994.

[10] 张婷婷. 六神曲的成分研究[D]. 沈阳：辽宁中医药大学，2017.

[11] 周俊彤，徐尚华，胡德夫. 匹拉米洞法、邻联甲苯胺法和联苯胺法检测林麝便隐血的比较[J]. 动物学杂志，2020，55(3)：401-406.

[12] 王亚东，徐志庆，夏 丹，等. 基于 NLRP3 炎症小体研究白头翁汤正丁醇提取物对白念珠菌定植下小鼠溃疡性结肠炎的作用机制[J]. 中草药，2022，53(13)：3997-4006.

[13] Xu Y, Xie Y B, Zhang X R, *et al*. Monitoring of the bacterial and fungal biodiversity and dynamics during *Massa Medicata Fermentata* fermentation[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(22): 9647-9655.

[14] 秦昆明，方前波，蔡宝昌. 指纹图谱技术在方剂现代研究中的应用现状[J]. 世界科学技术（中医药现代化），2009，11(2)：287-293.

[15] Lee C, Verma R, Byun S, *et al*. Structural specificities of cell surface β-glucan polysaccharides determine commensal yeast mediated immuno-modulatory activities [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3611.

[16] 邓奉红，胡秀婷，罗舜菁，等. 阿魏酰阿拉伯低聚木糖的制备、结构鉴定及构效关系[J/OL]. 食品科学：1-12(2023-03-19)[2023-10-27]. https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20230316.1230.020.html.

[17] 赖梦亭，肖 平，方悦悦，等. 中药多糖免疫调节作用机制研究进展[J]. 中草药，2023，54(10)：3337-3348.

[18] 周 欣，付志飞，谢 燕，等. 中药多糖对肠道菌群作用的研究进展[J]. 中成药，2019，41(3)：623-627.

[19] Fontenot J D, Rudensky A Y. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(4): 331-337.

[20] 常廷民，李秀敏，赵习德. 溃疡性结肠炎中医分型与 T 细胞亚群关系[J]. 辽宁中医杂志，2008，35(12)：1803-1805.

[21] Zhong Y B, Liu W J, Xiong Y X, *et al*. Astragaloside Ⅳ alleviates ulcerative colitis by regulating the balance of Th17/Treg cells[J]. *Phytomedicine*, 2022, 104: 154287.