

# 基于代谢组学和肠道菌群探讨黄芩汤对溃疡性结肠炎小鼠的影响

吴娜<sup>1,2</sup>, 朱璠<sup>2</sup>, 徐伟鸿<sup>2</sup>, 占彦雯<sup>2</sup>, 谢昌营<sup>1,2\*</sup>

(江西中医药大学附属医院, 江西南昌 330006, 2. 江西中医药大学, 江西南昌 330004)

**摘要:** 目的 代谢组学联合肠道菌群分析探讨黄芩汤对溃疡性结肠炎(UC)小鼠的作用。方法 BALB/c小鼠随机分为正常组、模型组、黄芩汤组(9.1 g/kg)、美沙拉秦组(0.2 g/kg),给予DSS诱导建立UC模型,造模的同时灌胃给药,连续7 d。给药结束后,记录小鼠体质量、大便秘状、隐血情况,并进行疾病活动指数(DAI)评分;HE染色观察结肠组织病理学改变,ELISA法检测血清IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 水平。超高效液相色谱串联质谱开展高分辨非靶向代谢组学研究,16S rDNA测序分析结肠内容物,Spearman法进行肠道菌群与代谢组学之间关联分析。结果 与模型组比较,黄芩汤组小鼠DAI评分降低( $P<0.05$ ),结肠长度增加( $P<0.05$ ),IL-6、TNF- $\alpha$ 水平降低( $P<0.05$ ),结肠病理组织学改善。代谢组学分析发现,正常组、模型组和黄芩汤组之间存在80个差异代谢物及包括苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成等在内的14条关键代谢通路。菌群测序显示3组之间差异菌群共15种,其中大肠埃希菌属-志贺氏菌属(*Escherichia-Shigella*)和拟杆菌属(*Bacteroides*)可能是关键菌群。Spearman相关性分析显示,1-oleoyl-l- $\alpha$ -lysophosphatidic acid与*Bacteroides*呈负相关,(phenoxymethyl) penicilloic acid与*Bacteroides*呈正相关。结论 黄芩汤可能是通过色氨酸等代谢通路,改善1-oleoyl-l- $\alpha$ -lysophosphatidic acid、(phenoxymethyl) penicilloic acid等代谢物纠正肠道菌群结构以减轻炎症反应,从而发挥对UC小鼠症状的改善作用。

**关键词:** 黄芩汤; 溃疡性结肠炎; 代谢组学; 肠道菌群; 16S rDNA 测序

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2024)12-4188-09

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.12.047

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种病因不明,以结肠黏膜连续性、弥漫性炎症改变为特点的慢性非特异性炎症性疾病<sup>[1-2]</sup>。因其病程长、治疗难度大、难根治、易反复、可癌变等特点,现被世界卫生组织列为现代社会最难治疗疾病之一<sup>[3-4]</sup>。代谢组学技术能够定量测定生物样品中内源性小分子产物变化,并结合生物信息学阐明代谢物与疾病之间关系<sup>[5]</sup>。人自出生以来肠道就有细菌定居,肠道微生物数量大约是机体细胞的10倍,是机体编码基因数量的100~150倍,被称为“人体第二基因组”,与人类健康息息相关<sup>[6]</sup>。研究显示,肠道菌群及代谢产物在炎症性肠病中起关键性作用<sup>[7]</sup>。黄芩汤由黄芩、白芍、甘草、大枣4味药组成,为“万世治利之祖方”,临床治疗UC效果显著、不良反应少,前期研究发现其作用改善UC的机制可能与抑制炎症反应、细胞焦亡、铁死亡等相关<sup>[8-11]</sup>。而黄芩汤治疗UC过程中是哪些细菌及代谢物产生作用,目前尚不清楚。因此,本研究采用代谢组学联合肠

道菌群方法对其进行探讨,旨在为黄芩汤的临床应用及推广提供依据。

## 1 材料

1.1 药物 黄芩汤由黄芩、白芍、炙甘草、大枣组成,黄芩、大枣(批号221201601、230201911)购自康美药业股份有限公司,白芍、炙甘草(批号220724、220109)购自江西江中中药饮片有限公司,以上药材经江西中医药大学附属医院陈浩副主任药师鉴定为正品。美沙拉秦肠溶片(批号L21009A)购自德国福克制药股份有限公司。

1.2 动物 48只SPF级雄性BALB/c小鼠,体质量(24 $\pm$ 2)g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供[实验动物生产许可证号SCXK(沪)2022-0004],饲养于江西中医药大学SPF级动物实验中心[实验动物使用许可证号SYXK(赣)2022-0002],温度(26 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,相对湿度(50 $\pm$ 5)%,12h/12h光暗循环,自由饮食。本动物实验获江西中医药大学医学伦理委员会批准(伦理号

**收稿日期:** 2024-06-14

**基金项目:** 国家自然科学基金(82160903, 82405409);江西省自然科学基金面上项目(20242BAB25556);江西省中医药中青年骨干人才(第四批)培养计划项目(赣中医药科教字[2022]7号);江西省中医药管理局科技计划重点项目(2022Z005);江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ211223);江西省2024年度研究生创新专项资金项目(YC2024-S735);江西省科学教育学会在校研究生课题(2023KXJYS036)

**作者简介:** 吴娜(1989—),女,博士,副主任中医师,从事中医药防治炎症性肠病研究。Tel: 13707918928, E-mail: wuna0791@163.com

\*通信作者: 谢昌营(1984—),男,硕士,副主任中医师,从事肛肠疾病的临床与实验研究。Tel: 15879037639, E-mail: xcyxycy85091@126.com

JZLLSC20210062)。

1.3 试剂 葡聚糖硫酸钠 (DSS) (美国 MP Biomedicals 公司, 货号 0216011090); TruSeq<sup>®</sup> DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 建库试剂盒 (美国 Illumina 公司, 货号 FC-121-9006); IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司, 货号 ml063159、ml037873、ml002095); 便隐血 (OB) 试剂 (匹拉米洞半定量检测方法) (珠海贝索生物技术有限公司, 货号 BA2020B)。

1.4 仪器 AB Triple TOF 6600 质谱仪 (美国 AB SCIEX 公司); Agilent 1290 Infinity LC 超高压液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); 5430R-Eppendorf 低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); Spectramac M3 多功能酶标仪 (美国 MD 公司)。

## 2 方法

2.1 黄芩汤溶液制备 参考课题组前期实验<sup>[9]</sup>及文献 [10-11] 报道, 黄芩、白芍、炙甘草、大枣按 3 : 2 : 2 : 2 的比例称取药材, 加入 10 倍体积纯水, 煎煮 1 h 后, 趁热滤过药液; 药渣加 8 倍体积纯水继续煎煮 1 h, 趁热滤过药液, 合并 2 次药液, 浓缩成 1 g/mL 的药液。

2.2 分组、造模及给药 小鼠适应性喂养 7 d 后, 随机分为正常组、模型组、黄芩汤组、美沙拉秦组, 每组 12 只。将 DSS 溶于无菌水中配成 3% DSS 溶液, 每隔 1 d 更换新鲜的 DSS, 连续 7 d 以诱导 UC 模型; 正常组自由饮用无菌水。造模的同时灌胃给药, 灌胃剂量按 70 kg 人临床用量, 以体表面积换算法折算成小鼠用量 (9.1 倍), 即黄芩汤组给予 9.1 g/kg 黄芩汤, 美沙拉秦组给予 0.2 g/kg 美沙拉秦, 其余组给予无菌水, 每天 1 次, 连续灌胃 7 d。

2.3 疾病活动指数 (DAI) 评分 每天记录小鼠体质量、大便性状及隐血情况, 进行疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评分, 公式为 DAI 评分 = (体质量下降评分 + 大便性状评分 + 大便隐血评分) / 3, 并绘制评分与时间关系曲线。其中小鼠体质量下降百分比计算公式为体质量下降百分比 = [(测定的小鼠体质量 - 实验开始时体质量) / 实验开始时小鼠体质量]  $\times$  100%。DAI 评分标准见表 1。

表 1 DAI 评分标准

项目	评分标准	评分/分
体质量下降百分比	无减少	0
	下降 0~5%	1
	下降 5%~10%	2
	下降 10%~20%	3
	下降超过 20%	4
大便性状	正常粪便	0
	粪便较软	1
	粪便湿软	2
	半稀便	3
	稀水样粪便	4
隐血	隐血阴性	0
	隐血阳性	2
	肉眼可见血便	4

2.4 样本收集 实验第 8 天, 小鼠摘眼球取血, 静置 1 h

后 3 500 r/min 离心 15 min, 分离上层血清, 7 只小鼠的血清用于 ELISA 试剂盒检测 IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$  水平, 另外 5 只小鼠的血清用于代谢组学分析。取血后取结肠, 部分置于干净白纸上, 沿肠系膜展开结肠并记录结肠长度; 收集结肠内容物于 1.5 mL 无菌 EP 试管中, 液氮速冻后置于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱保存, 用于后续 16S rDNA 扩增子测序; 洗净结肠上内容物后, 将结肠组织用 4% 多聚甲醛固定。

2.5 结肠组织病理形态观察 取固定后的结肠组织, 置于自动脱水机中脱水, 包埋, 石蜡切片, 60  $^{\circ}$ C 过夜后脱蜡, 经无水乙醇、梯度乙醇水化、苏木素-伊红 (HE) 染色、梯度乙醇脱水、透明剂透明、中性树胶封片后, 于光学显微镜下进行观察。

### 2.6 代谢组学分析

2.6.1 血清样本处理 随机选取正常组、模型组和黄芩汤组各 5 只小鼠血清样本, 委托上海中科新生命生物科技有限公司进行高分辨非靶向代谢组学分析。样本在 4  $^{\circ}$ C 环境下缓慢解冻后, 取适量样本加入预冷甲醇-乙腈-水 (2 : 2 : 1), 涡旋混合, 低温超声处理 30 min, 于 -20  $^{\circ}$ C 静置 10 min, 4  $^{\circ}$ C 离心 20 min, 取上清液真空干燥, 质谱分析时加入 100  $\mu$ L 50% 乙腈复溶, 涡旋, 4  $^{\circ}$ C 离心 15 min, 取上清液进样分析, 其中代谢物的识别与定量使用的方法为①实验图谱和标品数据库的匹配; ②理论二级质谱图匹配; ③保留时间矫正。

2.6.2 色谱条件 Waters ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱; 流动相水 (含 25 mmol/L 乙酸铵和 25 mmol/L 氨水) (A) -乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~0.5 min, 95% B; 0.5~7 min, 95%~65% B; 7~8 min, 65%~40% B; 8~9 min, 40% B; 9~9.1 min, 40%~95% B; 9.1~12 min, 95% B); 体积流量 0.5 mL/min; 柱温 25  $^{\circ}$ C; 进样量 2  $\mu$ L。

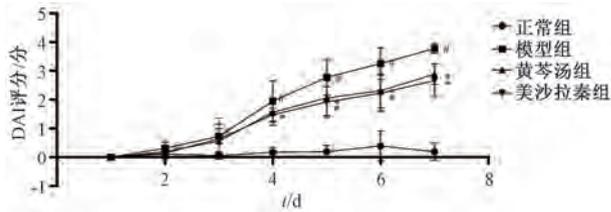
2.6.3 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI); 正、负离子扫描; 离子源电压  $\pm$  5 500 V; 离子源温度 600  $^{\circ}$ C; 雾化气辅助加热气 1 (Gas1) 压力 60 psi (1 psi = 6.895 kPa); 辅助加热气 2 (Gas2) 60 psi; 气帘气 (CUR) 压力 30 psi。

2.7 16S rDNA 测序 随机选取正常组、模型组和黄芩汤组各 5 只小鼠结肠内容物, 委托上海中科新生命生物科技有限公司进行测序。样本进行 DNA 提取, 根据测序区域的选择, 使用带 Barcode 的特异引物和高保真 DNA 聚合酶对选定的 V3~V4 可变区进行 PCR 扩增。使用建库试剂盒进行文库构建。构建好的文库通过 Agilent Bioanalyzer 2100 和 Qubit 进行质检, 文库质检合格后进行上机测序。根据扩增的 16S 区域特点, 基于测序平台利用双末端测序的方法, 构建小片段文库并进行双末端测序。通过对 Reads 拼接过滤、OTUs 聚类、物种注释及丰度分析可以揭示样品物种构成, 进一步挖掘样品之间的差异, 筛选差异菌群。

2.8 统计学分析 通过 SPSS 27.0 软件进行处理, 数据以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 2 组间均值比较采用独立样本 *t* 检验。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

3.1 黄芩汤对 UC 小鼠 DAI 评分及结肠长度的影响 如图 1 所示,与正常组比较,模型组小鼠从第 2 天开始 DAI 评分升高 ( $P<0.05$ );与模型组比较,黄芩汤组小鼠从第 5 天开始 DAI 评分降低 ( $P<0.05$ ),美沙拉秦组小鼠从第 4 天开始 DAI 评分降低 ( $P<0.05$ )。如图 2 所示,与正常组比较,模型组小鼠结肠长度缩短 ( $P<0.05$ );与模型组比较,黄芩汤组和美沙拉秦组小鼠结肠长度均延长 ( $P<0.05$ )。



注:与正常组比较,# $P<0.05$ ;与模型组比较,\* $P<0.05$ 。

图 1 黄芩汤对 UC 小鼠 DAI 评分的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=7$ )

3.2 黄芩汤对 UC 小鼠结肠组织病理变化的影响 如图 3

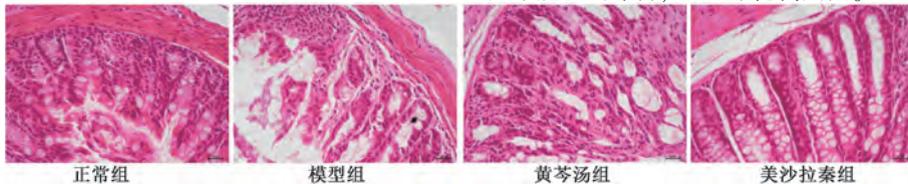


图 3 黄芩汤对 UC 小鼠结肠组织病理变化的影响 (HE 染色,  $\times 400$ )

3.3 黄芩汤对 UC 小鼠血清 IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$  水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清 IL-6、TNF- $\alpha$  水平升高 ( $P<0.05$ ),IL-10 水平降低 ( $P<0.05$ );与模型组比较,黄芩汤组小鼠血清 IL-6、TNF- $\alpha$  水平均降低 ( $P<0.05$ ),IL-10 水平无明显变化 ( $P>0.05$ ),见表 3。

表 2 黄芩汤对 UC 小鼠血清 IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$  水平的影响 (ng/L,  $\bar{x}\pm s, n=7$ )

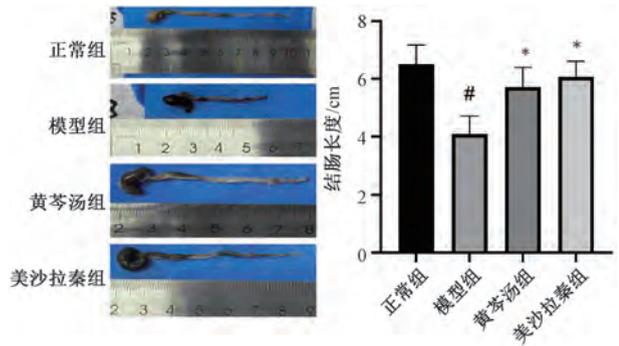
组别	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$
正常组	56.91 $\pm$ 7.91	123.36 $\pm$ 21.68	126.08 $\pm$ 39.83
模型组	137.44 $\pm$ 14.80 <sup>#</sup>	92.14 $\pm$ 15.48 <sup>#</sup>	281.94 $\pm$ 44.66 <sup>#</sup>
黄芩汤组	90.51 $\pm$ 18.38 <sup>*</sup>	103.86 $\pm$ 15.94	191.92 $\pm$ 32.51 <sup>*</sup>
美沙拉秦组	70.52 $\pm$ 10.89 <sup>*</sup>	114.87 $\pm$ 21.06 <sup>*</sup>	169.33 $\pm$ 31.67 <sup>*</sup>

注:与正常组比较,# $P<0.05$ ;与模型组比较,\* $P<0.05$ 。

3.4 血清代谢组学分析

3.4.1 总体样本主成分分析 (PCA) 将各组小鼠血清样本和质量控制 (quality control, QC) 样本提取得到的峰进行 PCA 分析,结果显示正、负离子模式下 QC 样本紧密聚集在一起,表明实验的重复性好,见图 4。

3.4.2 差异代谢物筛选 3 组间差异代谢物采用单因素方差分析并进行多重比较,其中筛选标准为  $P<0.001$ ,  $FC>1.5$  或  $FC<0.67$ 。最终共筛选出 80 个差异代谢物 (上调代谢物 50 个,下调代谢物 30 个)。将 80 个差异代谢物进行 KEGG 分析,以  $P<0.05$  为标准筛选代谢通路,最终得到包括蛋白质的消化和吸收,苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生



注:与正常组比较,# $P<0.05$ ;与模型组比较,\* $P<0.05$ 。

图 2 黄芩汤对 UC 小鼠结肠长度的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=7$ )

所示,正常组腺体结构正常,杯状细胞和黏膜上皮细胞无丢失,腺体内无炎症细胞浸润,部分腺体表面上皮内淋巴细胞局灶性增生,但其他结构正常;模型组可见腺体萎缩,杯状细胞广泛缺失,腺体内有大量炎症细胞浸润侵犯至肌层;黄芩汤组少量杯状细胞丢失,炎症细胞浸入肌层黏膜;美沙拉秦组腺体结构基本正常,杯状细胞丢失较前好转,炎症细胞浸润好转,局限于隐窝周围。

物合成,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成等在内的 14 条代谢通路,见图 5。

3.5 肠道菌群分析

3.5.1  $\alpha$  多样性分析  $\alpha$  多样性代表样本物种的均匀度和丰富度,主要包括 shannon、ACE、Chao1 指数。由图 6 可知,与正常组比较,模型组各指数均降低 ( $P<0.05$ );与模型组比较,黄芩汤组各指数均升高 ( $P<0.05$ ),结果表明,经 DSS 干预后,小鼠肠道菌群丰富度降低,而黄芩汤对小鼠肠道菌群丰富度有升高作用。

3.5.2  $\beta$  多样性分析 基于 Weighted Unifrac 距离的  $\beta$  多样性比较 3 组间肠道菌群组成差异,主坐标分析 (principal co-ordinates analysis, PCoA) 见图 7,结果显示模型组和黄芩汤组样本距离较大,说明菌群组成有明显差异;黄芩汤组与正常组的距离小于模型组与正常组的距离,黄芩汤组的样品逐渐趋向正常组,说明黄芩汤对 UC 小鼠肠道菌群结构有调控作用,可减轻 DSS 引起的小鼠肠道菌群变化。

3.5.3 菌群结构分析 在门水平上,与正常组比较,模型组拟杆菌门 (Bacteroidetes) 相对丰度降低,变形菌门 (Proteobacteria) 和厚壁菌门 (Firmicutes) 相对丰度升高;与模型组比较,黄芩汤组拟杆菌门相对丰度升高,变形菌门和厚壁菌门相对丰度降低,见图 8。在属水平上,与模型组比较,正常组和黄芩汤组 *Bifidobacterium* 属和 *Dubosiella* 属相对丰度均降低 ( $P<0.05$ ),见图 9~10。

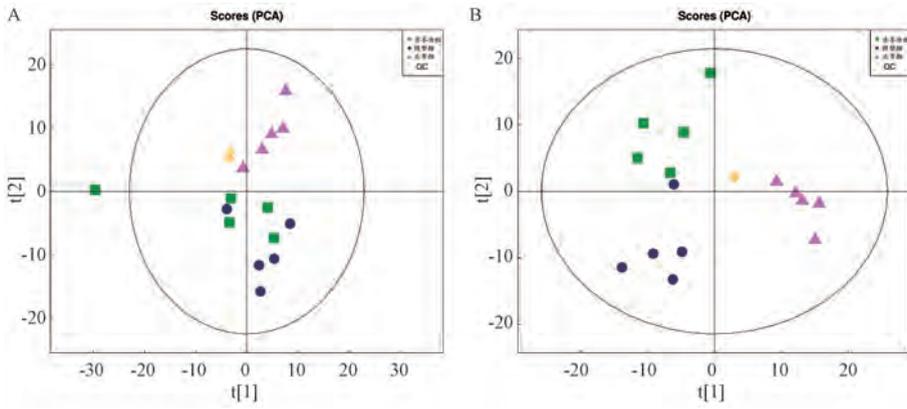


图4 正 (A)、负 (B) 离子模式总体样本的 PCA 分析

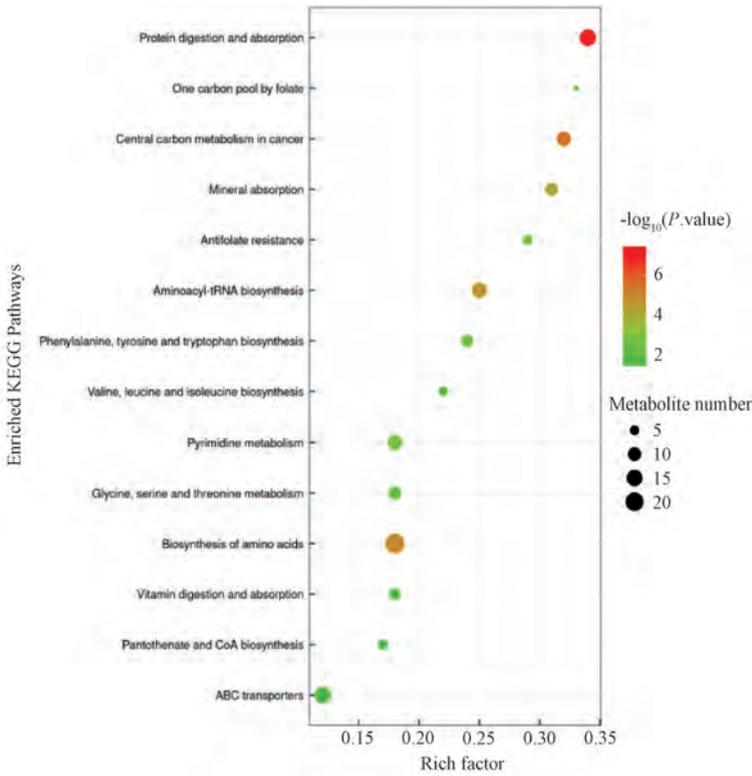
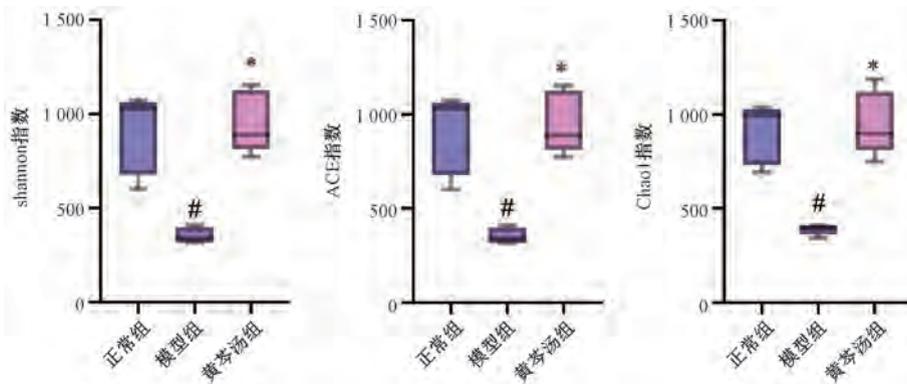


图5 KEGG 通路富集图



注：与正常组比较，# $P < 0.05$ ；与模型组比较，\* $P < 0.05$ 。

图6 各组 shannon、ACE、Chao1 指数比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

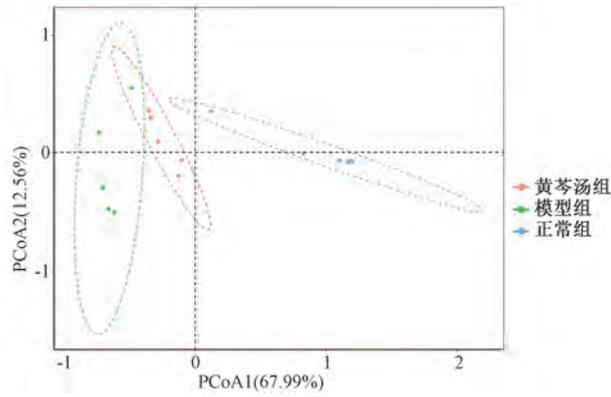


图7 基于 Weighted Unifrac 距离的各组小鼠肠道菌群 PCoA 分析

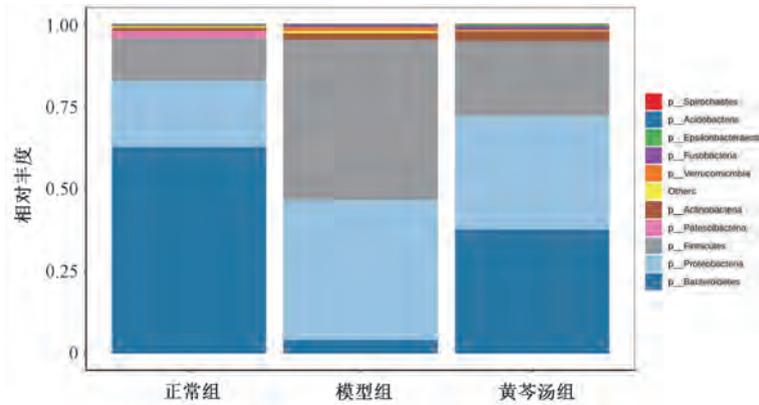


图8 各组样本门水平物种相对丰度柱状图

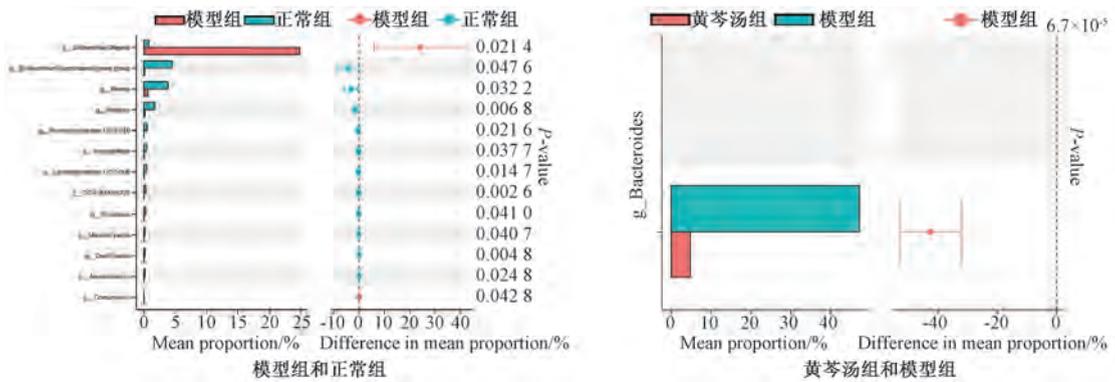


图9 各组样本属水平上的菌群差异

3.5.4 各组小鼠肠道菌群 LEfSe 分析 在 LEfSe 分析进化分支图中, 红色节点表示黄芩汤组中起到重要作用的微生物类群, 绿色节点表示模型组中起到重要作用的微生物类群, 蓝色节点表示正常组中起到重要作用的微生物类群, 黄色节点表示在 3 组内均没有起到重要作用的微生物类群。由内至外辐射的圆圈代表了由门至属的分类级别, 详见图 10。通过 LDA 分析统计, 不同组别中有重要物种的微生物类群的 LDA 值, LDA 值分布柱状图中红色、绿色和蓝色区域表示不同分组, 以  $P < 0.05$ ,  $LDA > 4$  为筛选标准, 确定组内相对丰度较高的微生物, 并通过 LDA 柱状图展示每个组内显著富集的物种, 以及比较各组间显著性差异物种, 如

图 10。黄芩汤组、模型组和正常组小鼠肠道菌群样品共筛选得到 15 个显著性差异物种。LEfSe 分析表明, 正常组在拟杆菌门 Bacteroidetes、拟杆菌纲 Bacteroidia、拟杆菌目 Bacteroidales、Muribaculaceae 中相对丰度较高, 模型组在厚壁菌门 Firmicutes、 $\gamma$ -变形菌纲 Gammaproteobacteria、丹毒丝菌纲 Erysipelotrichia、丹毒丝菌目 Erysipelotrichales、丹毒丝菌科 Erysipelotrichaceae、肠杆菌科 Enterobacteriaceae、肠杆菌目 Enterobacteriales、大肠埃希菌属-志贺氏菌属 *Escherichia-Shigella* 相对丰度较高, 黄芩汤组在拟杆菌科 Bacteroidaceae、拟杆菌属 *Bacteroides* 相对丰度较高。详见图 11。

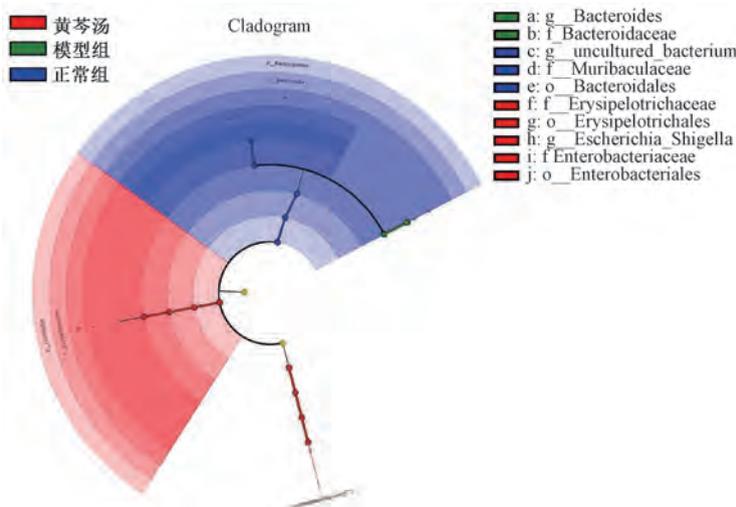


图 10 各组小鼠肠道菌群 LEfSe 进化分支图

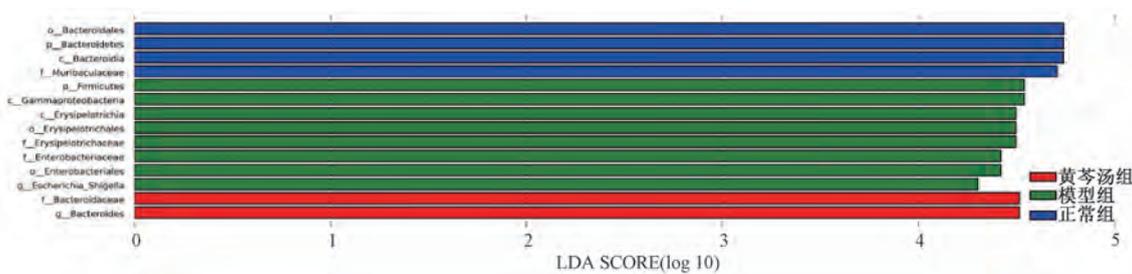


图 11 各组 LDA 值分布柱状图

3.6 肠道菌群和代谢组学关联分析 利用 Spearman 统计方法分析筛选得到的 80 个差异代谢物与 15 个差异菌群之间的相关性系数，以挖掘两者之间的相互作用关系，结果见图 12。图中展示了 607 对显著性相关的代谢物和差异菌属，其中有显著 ( $P < 0.01$ ) 相关性的有 397 对。根据  $P$  值，挑选 397 对中呈正相关的前 10 对和呈负相关的前 10 对进行分析，发现差异代谢物和差异菌群分别有 8 种。其中差异代谢物为 1, 2-dipentadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine、5 $\beta$ -pregnane-3 $\alpha$ , 17-diol-20-one、2-dhahma [ dmed-fahfa ]、N1-Methyl-2-pyridone-5-carboxamide、1-oleoyl-l- $\alpha$ -lysophosphatidic acid、3-ureidopropionic acid、cis-4, 7, 10, 13, 16, 19-docosaehaenoic acid、(phenoxymethyl) penicilloic acid。与正常组比较，模型组 1, 2-dipentadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine、5 $\beta$ -pregnane-3 $\alpha$ , 17-diol-20-one、2-dhahma [ dmed-fahfa ] 含量均降低 ( $P < 0.05$ )，(phenoxymethyl) penicilloic acid 含量降低，但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )；与模型组比较，黄芩汤组上述 4 种代谢物含量均升高 ( $P < 0.05$ )。与正常组比较，模型组 N1-methyl-2-pyridone-5-carboxamide、3-ureidopropionic acid、cis-4, 7, 10, 13, 16, 19-docosaehaenoic acid 含量均升高 ( $P < 0.05$ )；与模型组比较，黄芩汤组上述 3 种代谢物含量均降低 ( $P < 0.05$ )。

差异菌群为拟杆菌门 (Bacteroidetes)、拟杆菌纲 (Bacteroidia)、丹毒丝菌纲 (Erysipelotrichia)、拟杆菌目 (Bacteroidales)、丹毒丝菌目 (Erysipelotrichales)、拟杆菌

科 (Bacteroidaceae)、丹毒丝菌科 (Erysipelotrichaceae)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)。与正常组比较，模型组拟杆菌纲、拟杆菌目、拟杆菌门、拟杆菌科和拟杆菌属相对丰度降低；与模型组比较，黄芩汤组上述 5 种菌群相对丰度升高。与正常组比较，模型组丹毒丝菌纲、丹毒丝菌目及丹毒丝菌科相对丰度升高；与模型组比较，黄芩汤组上述 3 种菌群相对丰度降低。

#### 4 讨论

UC 的发病机制尚未阐明，结肠黏膜层炎症的严重程度与持续时间、发病率及死亡率密切相关<sup>[11]</sup>。IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$  是重要的炎症细胞因子，其中 IL-6 是诱导如 C 反应蛋白、血清淀粉样蛋白 A 等急性期蛋白的重要因素，在 UC 活动期 IL-6 水平升高，其水平与炎症严重程度呈正相关<sup>[12-13]</sup>。IL-10 为抑炎因子，对促炎因子的分泌起抑制作用从而抑制免疫反应<sup>[14]</sup>。TNF- $\alpha$  是炎症反应过程中出现最早、最重要的炎性介质，对中性粒细胞和淋巴细胞进入组织发生炎症反应起刺激作用，增加如 IL-6、IL-8 等促炎细胞因子及刺激肝细胞产生维持全身炎症的急性期蛋白<sup>[15]</sup>。由于其在免疫炎症性疾病的发病机制中的关键作用，TNF- $\alpha$  抑制剂 (英夫利昔单抗、阿达木单抗等) 已成功开发并用于治疗包括 UC 在内的诸多自身免疫性疾病<sup>[16]</sup>。本研究发现，模型组小鼠血清 IL-6、TNF- $\alpha$  水平升高，IL-10 水平降低；而给予黄芩汤后，小鼠血清 IL-6、TNF- $\alpha$  水平降低，IL-10 水平有升高趋势。结合课题组前期研究结果，推测黄

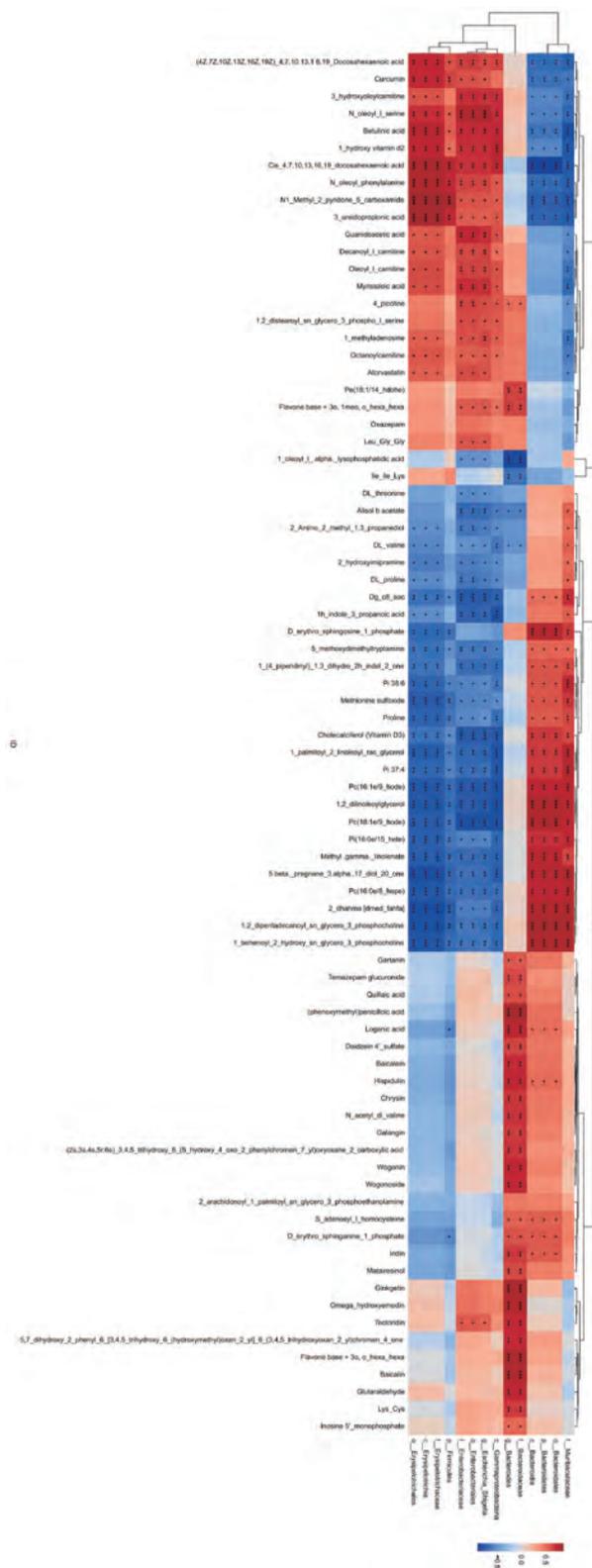


图 12 显著性差异菌群与显著性差异代谢物的 Spearman 相关性分析层次聚类热图

芩汤治疗 UC 的作用与抑制体内炎症反应关系密切。氨基酸作为是生物体内重要的营养物质，是促进肠道生长、维持黏膜完整和屏障功能的物质基础<sup>[17]</sup>。本研究通过代谢组学分析发现，黄芩汤作用于 UC 的机制与苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成，甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸

酸代谢，缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成等在内的 14 条代谢通路相关。缬氨酸 (valine, VAL)、亮氨酸、异亮氨酸统称为支链氨基酸 (branched chain amino acids, BCAA)<sup>[18]</sup>。BCAA 在维持和保护肠道生长及完整性方面发挥着重要作用，VAL 是产生细胞、免疫球蛋白、细胞因子

及其受体过程中是所必须的氨基酸。Chen 等<sup>[19]</sup>通过比较 UC 患者与健康个体之间的代谢物和肠道菌群,发现 UC 组 VAL 水平低于健康对照组,且与能量代谢和炎症过程相关。苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸 (tryptophan, TRP) 是人体必需氨基酸。TRP 对肠上皮屏障的完整性有改善作用,可减少炎症反应,血清中 TRP 水平与炎症性肠病之间呈现负相关<sup>[20-21]</sup>。TRP 的微生物代谢产物包括吲哚-3-醛 (indole-3-aldehyde, IAld)、吲哚-3-丙酸 (indolyl-3-propionic acid, IPA) 等, IAld、IPA 为芳香烃受体 (aryl hydrocarbon receptor, AHR) 的配体。AHR 是一种转录因子, AHR 活化可通过减少促炎因子的释放 (抑制 TNF- $\alpha$  等) 多种方式调节炎症反应并增强肠黏膜屏障功能<sup>[22]</sup>。另有研究发现,富含 TRP 的饮食可以改善 DSS 诱导的结肠炎模型,缺乏 TRP 可能对炎症性肠病的发展起促进作用<sup>[23]</sup>。

肠道菌群结构异常易引起肠道炎症性疾病, UC 患者与健康人相比,其肠道菌群多样性减少,菌群菌落丰度降低,且具有致炎能力的细菌增多<sup>[24]</sup>。本研究通过菌群 Lefse 分析发现,模型组大肠埃希菌属-志贺氏菌属 (*Escherichia-Shigella*) 相对丰度较高,而黄芩汤组拟杆菌属 (*Bacteroides*) 相对丰度较高。*Escherichia-Shigella* 主要通过将细菌的毒性蛋白转运至宿主细胞内,从而达到破坏肠上皮细胞及引起免疫功能失调的作用,以促进肠道炎症性疾病的发生<sup>[25]</sup>。拟杆菌门在健康人体肠道中占优势地位。李建军等<sup>[26]</sup>研究表明,健康人肠道菌群内的拟杆菌属数量明显高于 UC 患者。李琪等<sup>[27]</sup>研究表明,湿热证常表现为 *Bacteroides* 相对丰度的下降。湿热证是 UC 证型内最主要的证型之一,而黄芩汤是清热利湿法的代表方之一<sup>[28]</sup>。以上结果表明黄芩汤抗 UC 机制与改善肠道菌群关系密切。

本研究通过相关性结果分析表明,3 组差异代谢物 1-oleoyl-l- $\alpha$ -lysophosphatidic acid 与 *Bacteroides* 呈负相关, (phenoxymethyl) penicilloic acid 与 *Bacteroides* 呈正相关。1-oleoyl-l- $\alpha$ -lysophosphatidic acid 是一种丰富的溶血磷脂酸种类,其对脱脂转化酶受体具有强亲和力,而脱脂转化酶可以激活核因子- $\kappa$ B 引发炎症反应<sup>[29]</sup>。(phenoxymethyl) penicilloic acid 为苯唑西林钠的碱性降解物的主要成分,苯唑西林钠适用于各种耐药金葡萄球菌感染,亦具有抑制炎症反应的作用<sup>[30]</sup>。

综上所述,黄芩汤可能通过调控色氨酸等代谢通路,对 1-oleoyl-l- $\alpha$ -lysophosphatidic acid、(phenoxymethyl) penicilloic acid 等代谢指标起改善作用,对肠道菌群结构起纠正作用以减轻炎症反应,从而发挥对 UC 的治疗作用。

#### 参考文献:

[ 1 ] 中国中西医结合学会. 溃疡性结肠炎中西医结合诊疗专家共识[J]. 中国中西医结合杂志, 2023, 43(1): 5-11.  
[ 2 ] 郑晓金, 兰辉宇, 郭瑞芳. 174 例溃疡性结肠炎患者临床特征分析[J]. 中国实验诊断学, 2022, 26(1): 38-40.  
[ 3 ] 贾立伟, 孙 辉, 李 欣, 等. 溃疡性结肠炎药物治疗的研究进展[J]. 北京医学, 2018, 40(1): 63-65; 68.

[ 4 ] 陈泰宇, 唐学贵, 蒋小东, 等. 白术多糖基于 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路治疗溃疡性结肠炎小鼠的实验研究[J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33(8): 24-30.  
[ 5 ] 崔芙蓉, 杨佳颖, 王志刚, 等. 代谢组学在中医药领域的应用与展望[J]. 中草药, 2022, 53(14): 4512-4526.  
[ 6 ] 王娅颖, 邱智东, 王野湛, 等. 半夏泻心汤通过调节肠道菌群治疗溃疡性结肠炎的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(6): 1446-1450.  
[ 7 ] 仇振明, 王文学. 肠道菌群及其代谢物与溃疡性结肠炎的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2023, 51(3): 89-95.  
[ 8 ] 吴 娜, 毛祥坤, 万治平, 等. 溃疡性结肠炎活动期关键基因与治疗中药的生信分析及系统评价[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(11): 2677-2686.  
[ 9 ] 吴 娜, 万治平, 曾 娟, 等. 黄芩汤对溃疡性结肠炎小鼠氧化应激及铁死亡相关指标 GSH-Px4, P53, SLC7A11 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(8): 17-24.  
[ 10 ] 朱 琳, 王敦方, 冯 雪, 等. 黄芩汤对结肠炎相关性结肠癌肠道炎症和增殖的干预机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(22): 1-10.  
[ 11 ] Kaplan G G, Ng S C. Globalisation of inflammatory bowel disease: perspectives from the evolution of inflammatory bowel disease in the UK and China[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2016, 1(4): 307-316.  
[ 12 ] 刘 坤, 徐 菁, 马竹芳. 溃疡性结肠炎血清 IGF-1、IL-6、IL-18 表达水平的变化及意义[J]. 临床和实验医学杂志, 2023, 22(2): 140-143.  
[ 13 ] Taniguchi K, Karin M. IL-6 and related cytokines as the critical lymphpins between inflammation and cancer [ J ]. *Semin Immunol*, 2014, 26(1): 54-74.  
[ 14 ] 陈秋霞, 徐 晶, 盘启敏, 等. 壮医药线灸对围绝经期大鼠血清 IL-2、IFN- $\gamma$  和 IL4、IL10 表达的影响[J]. 世界科学技术 (中医药现代化), 2022, 24(10): 3737-3744.  
[ 15 ] Ye L L, Wei X S, Zhang M, et al. The significance of tumor necrosis factor receptor type II in CD8<sup>+</sup> regulatory T cells and CD8<sup>+</sup> effector T cells[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 583.  
[ 16 ] Leone G M, Mangano K, Petralia M C, et al. Past, present and (foreseeable) future of biological anti-TNF alpha therapy[J]. *J Clin Med*, 2023, 12(4): 1630.  
[ 17 ] 张炳艳, 吴 静, 牛俊坤, 等. 氨基酸在炎症性肠病治疗中的作用[J]. 胃肠病学, 2022, 27(10): 632-636.  
[ 18 ] Wessler L B, de Miranda Ramos V, Bittencourt Pasquali M A, et al. Administration of branched-chain amino acids increases the susceptibility to lipopolysaccharide-induced inflammation in young Wistar rats[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2019, 78: 210-214.  
[ 19 ] Chen L, Li P, Wang J, et al. Catabolism of nutritionally essential amino acids in developing porcine enterocytes [ J ]. *Amino Acids*, 2009, 37(1): 143-152.  
[ 20 ] Nikolaus S, Schulte B, Al-Massad N, et al. Increased tryptophan metabolism is associated with activity of inflammatory bowel diseases [ J ]. *Gastroenterology*, 2017, 153 ( 6 ): 1504-1516.

- [21] Liu G, Gu K, Wang F, et al. Tryptophan ameliorates barrier integrity and alleviates the inflammatory response to enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 through the CaSR/Rac1/PLC- $\gamma$ 1 signaling pathway in porcine intestinal epithelial cells[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 748497.
- [22] Cheng H, Liu J, Zhang D, et al. Ginsenoside Rg1 alleviates acute ulcerative colitis by modulating gut microbiota and microbial tryptophan metabolism[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 817600.
- [23] Scott S A, Fu J, Chang P V. Microbial tryptophan metabolites regulate gut barrier function via the aryl hydrocarbon receptor[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(32): 19376-19387.
- [24] 龙静怡, 梁爱华. 中药调控肠道菌群改善溃疡性结肠炎大肠湿热证的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(1): 244-254.
- [25] Xu J, Chen N, Wu Z, et al. 5-Aminosalicyclic acid alters the gut bacterial microbiota in patients with ulcerative colitis[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1274.
- [26] 李建军, 陈海泉. 溃疡性结肠炎患者肠道菌群分布特征分析[J]. 河南医学研究, 2022, 31(19): 3497-3500.
- [27] 李琪, 孙悦, 丁成华, 等. 泄泻湿证患者肠道菌群特征分析[J]. 中国中医基础医学杂志, 2022, 28(1): 108-113.
- [28] 岳宏, 王天芳, 陈剑明, 等. 溃疡性结肠炎常见中医证候及证候要素的现代文献研究[J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(5): 306-308.
- [29] 张杰, 李易易, 张兆辉. 溶血磷脂酸及其受体对中枢神经系统疾病影响的研究进展[J]. 卒中与神经疾病, 2019, 26(1): 118-121; 126.
- [30] 董新, 张梅. 苯唑西林钠碱性降解物的分析研究[J]. 临床医药文献电子杂志, 2016, 3(12): 2429; 2431.

## 基于血清代谢组学探究平喘颗粒对支气管哮喘大鼠的影响

蒋鹏娜<sup>1,2</sup>, 李竹英<sup>1</sup>, 田春燕<sup>1</sup>, 董文婷<sup>2</sup>, 霍金海<sup>2\*</sup>

(1. 黑龙江中医药大学附属第一医院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江省中医药科学院, 黑龙江 哈尔滨 150036)

**摘要:** 目的 观察平喘颗粒对支气管哮喘大鼠血清代谢轮廓的影响。方法 Wistar 大鼠随机分为空白组(7只)和造模组(21只), 利用抗原致敏和1% OVA 生理盐水溶液持续雾化激发6周建立哮喘模型, 将造模成功大鼠随机分为模型组、平喘颗粒组(5.4 g/kg)和地塞米松组(1 mg/kg), 每组7只, 灌胃给药1个月, 期间观察大鼠行为学变化。给药结束后, 检测大鼠血清炎症因子(IL-4、IL-13)水平, 观察肺组织病理改变。收集血清, 采用UPLC/Q-TOF-MS技术, 结合多元统计分析方法, 分析血清代谢谱的变化。结果 与模型组比较, 平喘颗粒可改善大鼠哮喘症状, 降低IL-4、IL-13水平( $P < 0.05$ ), 并能恢复肺组织炎性病理状态。在正负离子模式下, 共筛选出21个差异标志物, 包括磷脂类、胆汁酸类等, 平喘颗粒可明显回调其异常表达。结论 平喘颗粒有较强的修复肺组织的能力, 可通过恢复与细胞结构、功能密切相关的脂质代谢而起到平喘作用。

**关键词:** 平喘颗粒; 哮喘; 代谢组学; UPLC/Q-TOF-MS; 差异标志物; 磷脂; 胆汁酸

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)12-4196-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.12.048

支气管哮喘是一种气道慢性炎症性疾病, 目前全球约有3亿哮喘患者, 我国约占6.67%, 据统计全球每年死于该病的患者约有25万人<sup>[1]</sup>。哮喘属中医“哮证”范畴, “痰饮夙根”是其发病关键, 治疗应以“温阳益气、平喘化痰”为主。平喘颗粒来源于黑龙江中医药大学附属第一医院呼吸科临床常用经验方温阳平喘汤, 是临床运用近五

十年的有效制剂, 由淫羊藿、炙麻黄、黄芪、太子参、五味子、款冬花、地龙、罂粟壳、知母共9味药组成, 具有温阳益气、化痰平喘之功效, 用于治疗哮喘慢性持续期阳虚痰盛型, 亦可用于具有相同证候的其他哮喘病, 具有较好的临床疗效<sup>[2]</sup>。研究表明, 平喘颗粒具有较好的镇咳、祛痰、抗急、慢性炎症、抗疲劳、抗乏氧、提高免疫力、

收稿日期: 2024-01-16

基金项目: 国家自然科学基金(82074365); 国家自然科学基金青年基金(82104761); 黑龙江省博士后项目(LBH-Z19100)

作者简介: 蒋鹏娜(1981—), 女, 博士, 主治医师, 从事中西医结合治疗呼吸疾病的研究。Tel: 13946050281, E-mail: jpengna301@126.com

\*通信作者: 霍金海(1981—), 男, 博士, 研究员, 从事中药质量评价及药效物质基础研究。Tel: 15104596152, E-mail: jinhaihuo@126.com