

基于肠道菌群和炎症因子探讨牛至油对溃疡性结肠炎小鼠的作用

胡付豪¹, 刘玉晖¹, 梁新丽², 杨 辉², 许汉林³, 韩 飞^{1*}
(1. 江西中医药大学药学院, 江西 南昌 330004; 2. 江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004; 3. 湖北中医药大学药学院, 湖北 武汉 430065)

摘要: **目的** 研究牛至油对葡聚硫酸钠 (DSS) 诱导的溃疡性结肠炎小鼠的改善作用, 并探讨其可能的作用机制。**方法** 将小鼠随机分为正常组, 模型组, 阳性药组 (美沙拉嗪), 牛至油高、中、低剂量组, 大豆油组 (溶剂组), 每组 15 只, 造模同时灌胃给药, 连续 7 d。第 8 天, 处死小鼠并收集结肠、血清及粪便, HE 染色观察结肠组织病理变化, ELISA 法检测血清炎症因子水平, 16S rRNA 高通量测序法检测粪便中肠道菌群变化。**结果** 与正常组比较, 模型组小鼠疾病活动指数 (DAI) 评分和结肠组织病理评分升高 ($P<0.01$), 血清促炎因子 IL-1 β 、TNF- α 水平升高, 抑炎因子 IL-10 水平降低; 与模型组比较, 各给药组上述指标均有改善 ($P<0.05$, $P<0.01$), 其中牛至油高剂量组效果最佳。肠道菌群分析表明, 与正常组比较, 模型组小鼠肠道中乳酸菌属 (*Lactobacillus*) 等丰度有所降低, 而厚壁菌门 (*Firmicutes*)、变形菌门 (*Proteobacteria*)、放线杆菌门 (*Actinobacteriota*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、肠球菌属 (*Enterococcus*) 等丰度均有所上升; 与模型组比较, 各给药组各菌属丰度均有不同程度的变化。**结论** 牛至油对 DSS 诱导的小鼠溃疡性结肠炎有一定改善作用, 其机制可能与抑制葡萄球菌属、肠球菌属、变形菌门等有害菌的定植, 同时上调有益菌乳酸菌属的丰度, 保护肠黏膜屏障功能有关。

关键词: 牛至油; 溃疡性结肠炎; 炎症因子; 肠道菌群; 16S rRNA 高通量测序

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)04-1294-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.04.045

溃疡性结肠炎是一种由多病因引起的肠道免疫炎症, 世界卫生组织已将其确定为“现代难治愈疾病”之一^[1-2]。目前, 临床上治疗溃疡性结肠炎的药物较少且长期服用具有一定的副作用, 开发绿色安全、可长期服用的中药制剂具有较重要的意义。溃疡性结肠炎病因较为复杂^[3-4], 近年来大量研究表明肠道菌群与溃疡性结肠炎的发生、发展、治愈皆关系密切^[5-6]。因此, 调节肠道菌群、保护肠黏膜屏障, 是治疗溃疡性结肠炎的有效手段之一。

研究表明精油类成分对溃疡性结肠炎的改善具有积极作用^[7-8], 而这种改善作用可能与精油类成分的抗菌、抗炎及调节肠道菌群的作用有关^[9]。牛至油是从中药牛至中提取的挥发油, 对禽畜肠道致病性大肠杆菌、沙门菌和金黄色葡萄球菌具有一定的抑制作用^[10], 但目前未见关于牛至油对哺乳动物肠道菌群影响的报道。本研究采用 ELISA 法检测溃疡性结肠炎小鼠血清炎症因子水平, 16S rRNA 高通量测序检测肠道菌群丰富度及多样性, 探究牛至油对溃疡性结肠炎小鼠血清炎症因子及肠道菌群变化的影响, 以期对中药精油类成分对溃疡性结肠炎的治疗作用提供更多的实验依据。

1 材料

1.1 动物 7 周龄 SPF 级 BALB/c 雄性小鼠 150 只, 体重 (20 $\pm$ 2) g, 购于广东斯嘉景达生物科技有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (粤) 2020-0052, 实验动物使用许可证号 SYXK (赣) 2022-0002, 饲养于江西中医药大学药学院动物房。实验经江西中医药大学实验动物伦理委员会审查通过 (伦理号 20220827002)。

1.2 试剂与药物 牛至购于河南驻马店泌阳县, 经江西中医药大学生药教研室徐艳琴教授鉴定为唇形科牛至属多年生草本植物牛至 *Origanum vulgare* L., 参考文献 [11] 报道, 采用水蒸气蒸馏法提取挥发油, 密闭冷藏备用。葡聚硫酸钠 (DSS, 100 g, 批号 S6132, 美国 MP 生物医疗公司); 注射用大豆油 (江西鑫森天然植物油有限公司, 批号 20210501)。美沙拉嗪缓释颗粒 (上海爱的发制药有限公司, 0.5 g/袋, 共 10 袋, 批号 210309)。IL-10、TNF- α ELISA 试剂盒 (江苏酶免实业有限公司, 批号 MM-0176M1、MM-0132M1); IL-1 β ELISA 试剂盒 (武汉华美生物工程公司, 批号 M04034302); 苏木素染液 (北京雷根根生物技术有限公司, 批号 DH0006)。无水乙醇、二甲苯

收稿日期: 2022-10-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81560659, 81860771); 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ201219, GJJ2200903); 江西中医药大学博士科研启动基金 (2018WBZR011); 大学生创新创业训练计划项目 (202010412143, 202110412003)

作者简介: 胡付豪 (1996—), 男, 硕士生, 研究方向为中药新剂型与新技术。E-mail: 510496820@qq.com

* 通信作者: 韩 飞 (1981—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药新剂型与新技术。Tel: (0791) 87118991, E-mail: hanfei8454871@163.com

(国药集团化学试剂有限公司, 批号 100092683、10023418)。

1.3 仪器 MultiskanMK3 型酶标仪 (美国 Thermo Scientific 公司); SQP 型电子天平 [赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司]; TG16-WS 型台式高速离心机 (长沙湘智离心机仪器有限公司); JYTQ-50L 型智能中药精油提取机 (江西赫柏康华制药设备有限公司); LDR 型电加热蒸汽发生器 (上饶市江心锅炉有限公司)。

2 方法

2.1 药物制备 分别取 40、20、10 mg 牛至油, 置于 10 mL 量瓶中, 加入注射用大豆油, 定容, 即得 4、2、1 mg/mL 的牛至油-大豆油溶液。精密称取美沙拉嗪颗粒 0.4 g, 研碎后加入适量超纯水溶解, 移入 10 mL 量瓶中, 超纯水定容, 即得 40 mg/mL 美沙拉嗪溶液。

2.2 造模及给药 将 150 只小鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为正常组, 模型组, 阳性药组, 牛至油高、中、低剂量组, 大豆油组 (溶剂组), 每组 15 只, 正常组小鼠每天给予 50 mL 纯水自由饮用, 其余各组均给予等量 3% DSS 溶液 (每天现配现用) 自由饮用^[12], 同时, 阳性药组灌胃给予 400 mg/kg 美沙拉嗪缓释颗粒溶液 (40 mg/mL); 结合文献 [13] 报道及预实验结果, 牛至油高、中、低剂量组灌胃给予 40、20、10 mg/kg 牛至油-大豆油溶液 (4、2、1 mg/mL); 正常组、模型组灌胃等体积生理盐水; 大豆油组灌胃等体积注射用大豆油, 各组连续给药 7 d。

2.3 取材 给药结束后, 每组随机选 6 只小鼠, 轻轻挤压腹部促使排便, 将粪便装入经过灭菌的塑料管中, 标号, 在-80 ℃下保存。取完粪便后, 所有小鼠禁食不禁水 12 h, 记录体质量, 眼眶取血, 5 000 r/min 离心 5 min, 取血清, 于-80 ℃下保存。将取血后的小鼠脱颈处死, 解剖取全结肠 (自回盲末端至肛门), PBS 溶液冲洗并吸干水分后量取长度, 称定质量, 剪取约 2 cm, 放入 4% 多聚甲醛溶液中固定。

2.4 疾病活动指数 (DAI) 评分 造模期间每天记录小鼠体质量、粪便性状、便血情况, DAI 评分 = (体质量下降率分数 + 粪便形状分数 + 便血分数) / 3^[14], 评分标准见表 1。

表 2 各组小鼠结肠长度及 DAI 评分比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	体质量/g	结肠长度/cm	DAI 评分/分
正常组	—	27.51±0.68	10.26±0.52	0.76±0.32
模型组	—	21.61±2.60**	6.26±0.82**	2.38±0.45**
阳性药组	400	24.08±1.87 ^{##}	7.27±0.61 ^{##}	1.52±0.47
牛至油高剂量组	40	25.46±2.79 [△]	9.50±1.06 [△]	0.89±0.70
牛至油中剂量组	20	24.63±0.89	8.37±0.64	1.10±0.46
牛至油低剂量组	10	23.79±2.53	8.50±1.18	1.24±0.32
大豆油组	—	22.83±1.64**	8.29±0.88** ^{##}	1.53±0.79**

注: 与正常组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, ^{##} $P<0.01$; 与大豆油组比较, [△] $P<0.05$ 。

3.2 牛至油对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织病理形态及评分的影响 图 1 显示, 正常组与牛至油高剂量组小鼠结肠组织无病变; 而模型组小鼠可见结肠组织多发溃疡, 溃疡中

表 1 DAI 评分标准

评分/分	体质量下降率/%	粪便形状	便血情况
0	0(无下降)	正常	正常
1	0~5	软便	介于正常和隐性出血之间
2	5~10	松散	隐性出血
3	10~15	稀便	介于隐性出血和显性出血之间
4	>15	水样便	显性出血

2.5 HE 染色观察结肠组织病理变化 取于 4% 二甲苯溶液中固定的结肠, 梯度乙醇脱水, 经二甲苯透明、石蜡包埋后切成薄片, 脱蜡后苏木素和伊红溶液染色, 在显微镜下观察其病理变化^[15]。

2.6 ELISA 法检测血清炎症因子水平 研究表明, 溃疡性结肠炎的发生与促炎因子和抑炎因子的失衡有着密切关联^[16]。取-80 ℃保存的血清, 融化后 5 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清抑炎因子 IL-10 和促炎因子 IL-1 β 、TNF- α 水平。

2.7 16S rRNA 高通量基因测序 取于-80 ℃冰箱中保存的小鼠粪便, 按标签分装, 由上海美吉生物医药科技有限公司进行基因测序。经 DNA 抽提和 PCR 扩增、Illumina Miseq 测序、原始数据处理等操作, 采用 UPARSE 软件 (version 7.1), 根据 97% 相似度对序列进行 OTU 聚类并剔除嵌合体。利用 RPD classifier 对每条序列进行物种分类注释, 对比 Silva 数据库 (SSU128), 设置对比阈值为 70%。

2.8 统计学分析 通过 SPSS 21.0 软件进行处理, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 牛至油对溃疡性结肠炎小鼠结肠长度及 DAI 评分的影响 如表 2 所示, 与正常组比较, 模型组和大豆油组小鼠体质量、结肠长度均降低 ($P<0.01$), DAI 评分均升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 大豆油组小鼠结肠长度增加 ($P<0.01$), 阳性药组小鼠体质量、结肠长度均增加 ($P<0.01$); 与大豆油组比较, 牛至油高剂量组小鼠体质量、结肠长度均增加 ($P<0.05$)。以上结果表明, 大豆油与美沙拉嗪均能在一定程度上改善溃疡性结肠炎小鼠的症状, 并且高剂量牛至油对该症状的改善作用强于大豆油。

多淋巴细胞浸润, 溃疡深达黏膜下层, 病变范围广泛, 溃疡附近隐窝结构被破坏; 其余各组均较模型组有不同程度的好转。

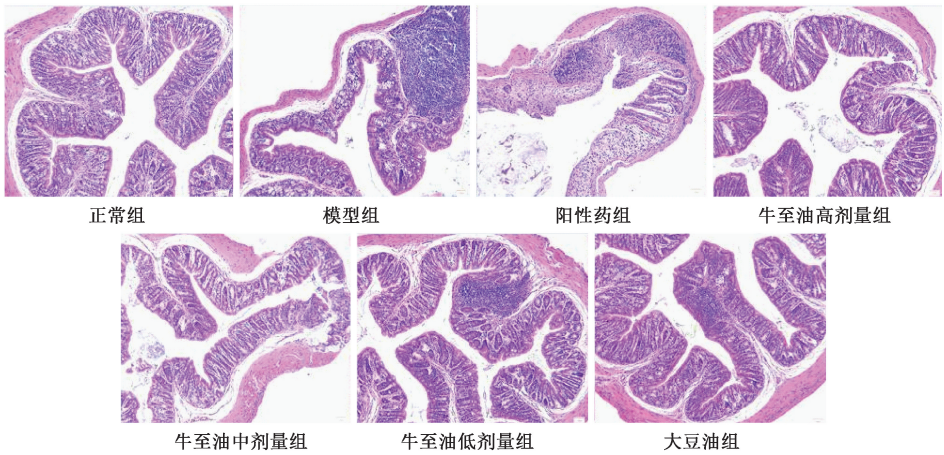


图 1 各组小鼠结肠组织病理 HE 染色 (×100)

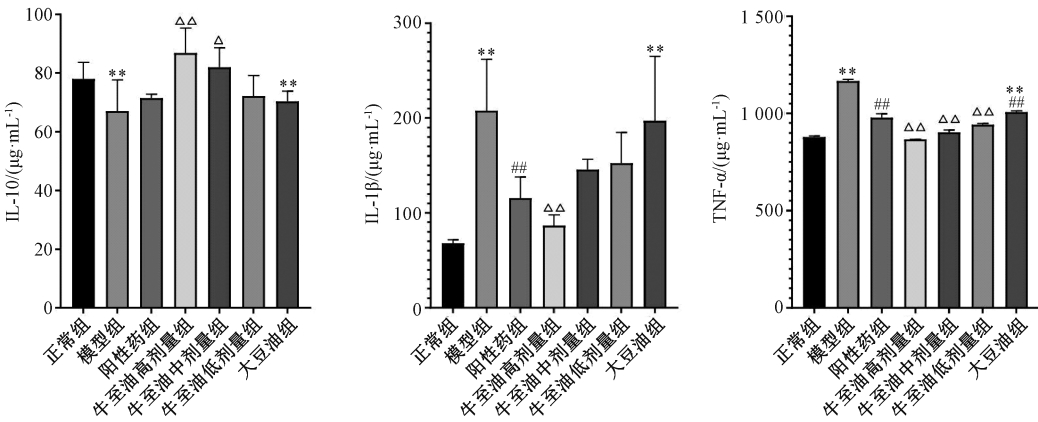
由表 3 可知,与正常组比较,模型组、大豆油组小鼠病理评分均升高 ($P<0.01$);与模型组比较,大豆油组、阳性药组小鼠病理评分均降低 ($P<0.01$);与大豆油组比较,牛至油高剂量组小鼠结肠组织病理评分降低 ($P<0.01$)。以上结果表明,大豆油与美沙拉嗪均能在一定程度上抑制溃疡性结肠炎小鼠结肠组织炎症反应,并且高剂量牛至油的抑炎效果强于两者。

表 3 各组小鼠结肠组织病理评分比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)		
组别	剂量/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	综合评分/分
正常组	—	0.17±0.41
模型组	—	9.33±1.37**
阳性药组	400	5.33±2.88##
牛至油高剂量组	40	0 ^{△△}
牛至油中剂量组	20	2.33±1.86
牛至油低剂量组	10	1.66±2.58
大豆油组	—	3.33±2.73**##

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$;与大豆油组比较,△△ $P<0.01$ 。

3.3 牛至油对溃疡性结肠炎小鼠血清炎症因子水平的影响 如图 2 所示,与正常组比较,模型组、大豆油组小鼠血清促炎因子 IL-1 β 、TNF- α 水平均升高 ($P<0.01$),而抑炎因子 IL-10 水平均降低 ($P<0.01$);与模型组比较,阳性药组小鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 水平均降低 ($P<0.01$),大豆油组小鼠血清 TNF- α 水平降低 ($P<0.01$);与大豆油组比较,牛至油高剂量组小鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 水平降低 ($P<0.01$),IL-10 水平升高 ($P<0.01$),中剂量组小鼠血清 TNF- α 水平降低 ($P<0.01$),IL-10 水平升高 ($P<0.05$),低剂量组小鼠血清 TNF- α 水平降低 ($P<0.01$)。以上结果表明,牛至油对溃疡性结肠炎小鼠体内促炎-抑炎因子的平衡具有明显积极作用,并且优于美沙拉嗪和大豆油。

3.4 牛至油对溃疡性结肠炎小鼠肠道菌群变化的影响 牛至油高剂量组药效优于低、中剂量组及阳性药组,故选择正常组、模型组、阳性药组、牛至油高剂量组及大豆油组进行肠道菌群的分析。



注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$;与大豆油组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$ 。

图 2 各组小鼠血清 IL-10、IL-1 β 、TNF- α 水平 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

3.4.1 物种注释与评估 物种注释与评估包括 OTU 稀释性曲线及 Alpha 多样性分析。其中,测序量与 OTUs 的相关曲线见图 3A,测序量达一定数值后,OTUs 数量值稳定,样

本曲线趋于平缓,表明实验的测序数据量能全面反映样本中总的 OTUs 量。Alpha 多样性分析用以反映菌群的丰富度和多样性,其中 Ace 指数代表菌群丰富度,Ace 指数越大,

样品中菌群的丰富度越高；Shannon 指数用来估算样品中微生物的多样性，其数值越大，菌群多样性越高，结果见图 3B~3C。模型组小鼠肠道菌群丰富度及多样性较正常小鼠有所下降；牛至油高剂量组、阳性药组 Ace 指数明显高于模型组，表明牛至油、美沙拉嗪均能在一定程度上改善溃

疡性结肠炎小鼠肠道菌群的丰富度；大豆油组 Ace 指数略高于模型组，但无显著性差异 ($P>0.05$)，表明大豆油对肠道菌群丰富度的影响不如牛至油、美沙拉嗪；在 Shannon 指数方面，除正常组外，其余各组与模型组比较均无显著性差异 ($P>0.05$)。

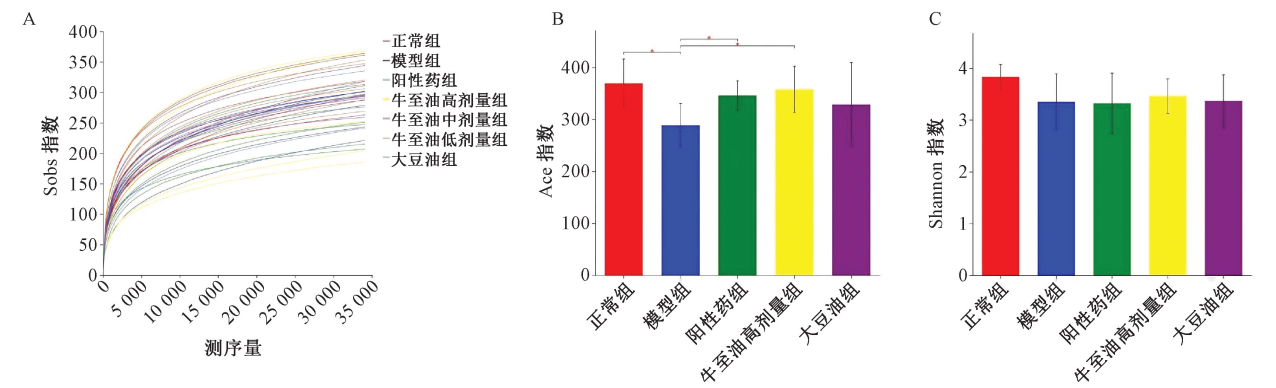


图 3 物种注释与评估 ($n=6$)

3.4.2 群落组成分析 如图 4 所示，对门水平丰度排名前十的物种进行统计，与正常组比较，其余各组 *Bacteroidata* (拟杆菌门)、*Campilobacterota* (弯毛杆菌门)、*Deferribacterota* (去铁杆菌门) 丰度均有所下降，程度依次为模型组>大豆油组>阳性药组>牛至油高剂量组；厚壁菌门、*Verrucomicrobiota* (疣微菌门)、*Actinobacteriota* (放线杆菌门)、*Proteobacteria* (变形菌门) 丰度均有所上升，程度依次为模型组>大豆油组>阳性药组>牛至油高剂量组。

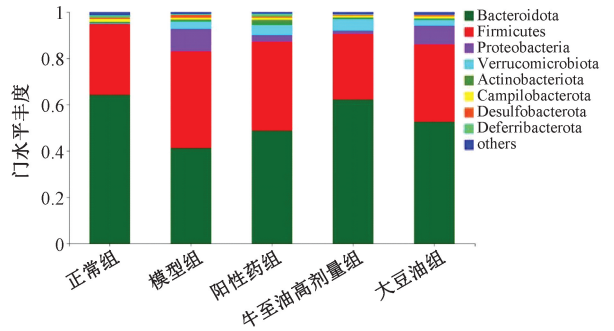


图 4 门水平群落 bar 图 ($n=6$)

对属水平排名前十的物种进行统计，见图 5，可知与正常组比较，其余各组 *Bacteroides* (拟杆菌属)、*Lachnospiraceae_NK4A136_group*、*Prevotellaceae_UCG-001* 丰度有所升高；*Bacteroidesnorank_f_Muribaculaceae* (绒毛杆菌属)、*Akkermansia*、*Parabacteroides* 丰度降低。*Alloprevotella* (异普雷沃氏菌)、*Lactobacillus* (乳酸菌属) 在模型组、阳性药组及大豆油组中丰度降低，而在牛至油高剂量组中丰度有所升高。此外还有 2 个菌属虽然丰度相对较低，但与溃疡性结肠炎的发生发展密不可分，它们是 *Staphylococcus* (葡萄球菌属) 和 *Enterococcus* (肠球菌属)，表明葡萄球菌、肠球菌在正常组、牛至油高剂量组中几乎不存在，但在模型组、阳性药组、大豆油组中丰度明显

上升。以上结果表明，牛至油可上调溃疡性结肠炎小鼠肠道中拟杆菌门、弯毛杆菌门、去铁杆菌门、乳酸菌属、异普雷沃氏菌属等菌种丰度，下调厚壁菌门、疣微菌门、放线杆菌门、变形菌门、脱硫细菌门、拟杆菌属、肠球菌属、葡萄球菌属等菌种丰度。

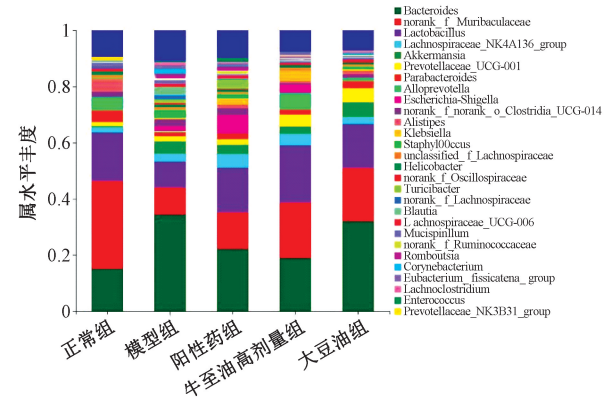


图 5 属水平群落 bar 图 ($n=6$)

3.4.3 Beta 多样性分析 Beta 多样性分析可显示组内与组间差异的大小，并以此判断分组是否有意义。由 PCA 分析图 (图 6A) 可知，与正常组肠道菌群组成距离最近的为牛至油高剂量组，其次为阳性药组、大豆油组和模型组， $R=0.6212$ ，接近于 1； $P<0.05$ ，表明组间差异具有显著性。而 NMDS 分析 (图 6B) 与 PCA 分析结果一致， $stress<0.05$ ，表明具有很好的代表性。

3.4.4 物种差异分析 采用组间差异性检验，见图 7，可知相较于正常组，其余各组 *norank_f_Muribaculaceae* (绒毛杆菌属)、*Alloprevotella* (伊普雷沃氏菌属)、*Parabacteroides* 菌属丰度均有所降低；而 *Akkermansia*、*Prevotellaceae_UCG-001*、*Staphylococcus* (葡萄球菌属)、*Turicibacte*、*Romboutsia*、*Lachnospiraceae_UCG-006*、*Corynebacterium* 菌属丰度均有所

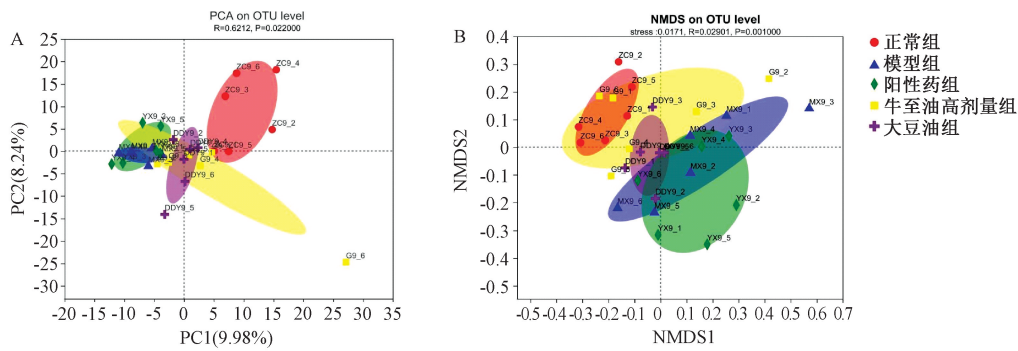
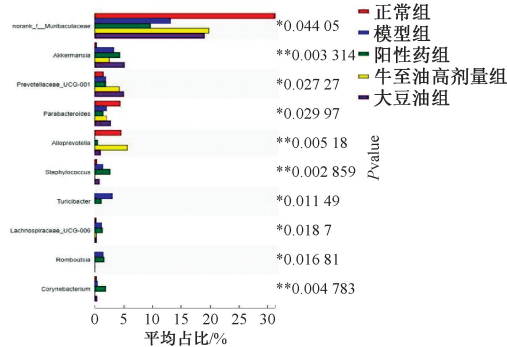


图 6 OUT 水平 PCA 分析 (A) 和 NMDS 分析 (B) (n=6)

上升,其中牛至油高剂量组与正常组最接近。以上结果表明,正常组与模型组、阳性药组、大豆油组及牛至油高剂量组小鼠肠道菌群物种组成确有一定差异,其中牛至油高剂量组与正常组之间的差异性最小。



注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

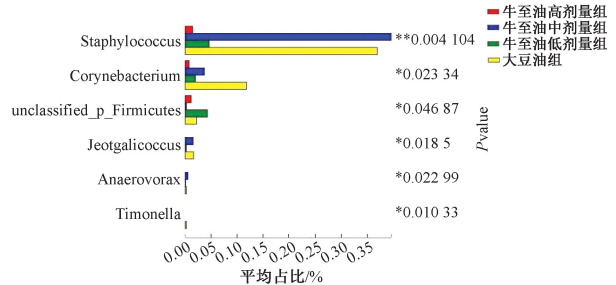
图 7 组间差异显著性检验 (n=6)

3.4.5 牛至油与大豆油组间差异比较 大豆油中含棕榈酸 7%~10%,硬脂酸 2%~5%,花生酸 1%~3%,油酸 22%~30%,亚油酸 50%~60%,亚麻油酸 5%~9%^[17]。大豆油的脂肪酸构成较合理,它含有丰富的亚油酸,有良好的降低血清胆固醇水平、预防心血管疾病功效^[18]。如图 8 所示,各剂组与大豆油组之间具有显著性差异的菌属为 *Staphylococcus* (葡萄球菌)、*Corynebacterium*、*unclassified-p_Firmicutes*、*Jeotgalicoccus*、*Anaerovorax*、*Timonella*,其中在葡萄球菌水平上差异最显著 ($P<0.01$),牛至油高剂量组中葡萄球菌的丰度明显低于其他 3 组。

4 讨论

炎症因子与溃疡性结肠炎关系密切。其中,IL-10 是典型的炎症抑制因子,具有强大的免疫抑制作用^[19],被看作溃疡性结肠炎恢复的判别标准之一^[20];IL-1 β 能介导多种炎症反应^[21],贯穿了溃疡性结肠炎发展的全过程^[22];TNF- α 能够诱导肠上皮细胞的凋亡、阻碍肠黏膜溃疡的修复、促进 C 反应蛋白的释放加重炎症的程度^[23-24]。本研究表明,牛至油可升高小鼠血清 IL-10 水平并降低 IL-1 β 、TNF- α 水平,有效缓解溃疡性结肠炎小鼠的炎症反应。

此外,溃疡性结肠炎患者的显著特征之一为肠道内



注:与大豆油组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图 8 牛至油与大豆油组间差异性检验 (n=6)

有害菌增加、有益菌减少。由于肠道菌群与肠黏膜屏障密切相关,故推测牛至油可通过调节肠道菌群,保护肠黏膜屏障,降低有害菌和肠毒素对肠道上皮细胞的损害作用。

4.1 牛至油对肠黏膜机械屏障的影响 肠黏膜机械屏障是由完整的上皮细胞和上皮细胞之间的紧密连接蛋白组成。大量研究表明,一些中药的天然成分可通过上调乳酸菌的丰度促进紧密连接蛋白的分泌^[25],保护肠道上皮细胞的紧密连接^[26],降低肠黏膜的通透性^[27],增强肠黏膜机械屏障^[28]。此外葡萄球菌(如金黄色葡萄球菌)会分泌一些具有肠毒性的毒素^[29],增加结肠上皮通透性^[30]。本研究结果显示,牛至油可以上调乳酸菌的丰度,下调葡萄球菌、肠球菌的丰度,其对溃疡性结肠炎小鼠的改善作用可能是通过调节肠道菌群,增加紧密连接蛋白的分泌,降低有害菌及肠毒素对肠道上皮细胞的破坏作用而实现的。

4.2 牛至油对肠黏膜免疫屏障的影响 肠黏膜免疫屏障包括肠黏膜相关淋巴组织和胃肠道排泄的抗体,如分泌型免疫球蛋白(sIgA)等。乳酸菌可增强 T 细胞和 B 细胞对抗原的反应性,发挥特异性免疫作用,使分泌 sIgA 的量增加^[31],同时增强机体的免疫应答^[32]。本研究表明,牛至油可能通过上调乳酸菌丰度,刺激 sIgA 的分泌并激活肠黏膜 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞,增强了肠黏膜免疫屏障。

4.3 牛至油对肠黏膜生物屏障的影响 肠黏膜生物屏障是肠道定植菌在肠腔内形成的一个多层生物膜,生物屏障隔绝了有害菌与肠道上皮细胞的直接接触。研究表明,乳酸菌的 s 层蛋白参与组织粘附并能够抑制有害菌对肠道上皮细胞的侵袭^[33],保护了肠道上皮细胞的紧密连接和正常生

理功能。本研究表明，牛至油可上调乳酸菌的丰度，增强小鼠肠黏膜生物屏障，隔绝葡萄球菌、肠球菌等有害菌对肠黏膜机械屏障的攻击，缓解炎症反应。

综上所述，牛至油可能通过上调乳酸菌等有益菌的丰度，下调葡萄球菌、肠球菌、放线杆菌及变形菌等有害菌的丰度，从而增强了肠黏膜机械、免疫和生物屏障，同时抑制 IL-1 β 、TNF- α 的分泌并促进 IL-10 的释放，最终达到改善溃疡性结肠炎小鼠炎症反应的作用。

参考文献：

[1] 崔畅婉, 孙峥嵘. 溃疡性结肠炎发病机制研究进展[J]. 现代免疫学, 2019, 39(1) : 77-81.

[2] Porter R J, Kalla R, Ho G T. Ulcerative colitis: Recent advances in the understanding of disease pathogenesis [J]. *F1000Res*, 2020, 9(F1000 Faculty Rev) : 294.

[3] Du L, Ha C. Epidemiology and pathogenesis of ulcerative colitis [J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2020, 49(4) : 643-654.

[4] 匡 琪, 王爱祥, 向 瑶. 心理因素、肠道菌群、环境与溃疡性结肠炎发病的关系分析[J]. 中国卫生统计, 2021, 38(5) : 742-745; 749.

[5] Chen X L, Lou L, Tang H Y, *et al.* Adsorptive granulomonocytapheresis alters the gut bacterial microbiota in patients with active ulcerative colitis[J]. *J Clin Apher*, 2021, 36(3) : 454-464.

[6] Zou J F, Shen Y M, Chen M J, *et al.* Lizhong decoction ameliorates ulcerative colitis in mice *via* modulating gut microbiota and its metabolites [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(13) : 5999-6012.

[7] 申进增. 基于 16S rDNA 测序技术分析当归挥发油对自发性高血压大鼠肠道菌群的影响[D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2021.

[8] 刘晓兰, 张永忠, 张俊玲, 等. 苍术挥发油对溃疡性结肠炎大鼠的改善作用[J]. 天津医药, 2020, 48 (10) : 956-960.

[9] Wei D N, Zhao Y F, Zhang M M, *et al.* The volatile oil of *Zanthoxylum bungeanum* Pericarp improved the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and gut microbiota to attenuate chronic unpredictable stress-induced anxiety behavior in rats[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 769-786.

[10] 黄佳琦, 蒋青青, 钟友宝, 等. 四神丸挥发油对慢性溃疡性结肠炎小鼠 TLR/MyD88 信号通路的调控作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(23) : 19-25.

[11] 韩 飞. 中药抗生素牛至注射亚微乳的制备及药效学研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2016.

[12] 衡 宇, 李 晰, 孙 涛, 等. 葡聚糖硫酸钠自由饮用与灌胃诱导小鼠溃疡性结肠炎模型的对比研究[J]. 中国药师, 2017, 20(4) : 603-606.

[13] 欧 锐, 南旭梅, 吕旭英, 等. 牛至油对小鼠灌胃给药的急性毒性试验[J]. 动物医学进展, 2017, 38(5) : 64-68.

[14] 蔡兴炎, 李枝锦, 林力森, 等. 愈肠止痢方对活动期溃疡性结肠炎患者疾病活动度及肠黏膜屏障功能的影响[J].

现代中西医结合杂志, 2021, 30(25) : 2816-2819.

[15] 谭 悦, 关雅迪, 郑长清. 山姜素对葡聚糖硫酸钠诱导小鼠溃疡性结肠炎的保护作用及其作用机制研究[J]. 现代药物与临床, 2018, 33(6) : 1303-1311.

[16] Ansari M N, Rehman N U, Karim A, *et al.* Role of oxidative stress and inflammatory cytokines (TNF- α and IL-6) in acetic acid-induced ulcerative colitis in rats: Ameliorated by *Otostegia fruticosa*[J]. *Life (Basel)*, 2021, 11(3) : 195.

[17] 高艺恬, 赵丽梅, 盛 明, 等. GC 和 GC-MS 法测定注射用大豆油中脂肪酸组成及含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2013, 30(9) : 704-708.

[18] Alencar S A D S, Kiefer C, Nascimento K M R S, *et al.* Dietary soybean oil modulates fatty acid composition of pork[J]. *Trop Anim Health Prod*, 2021, 53(3) : 357.

[19] 李晓东, 张学彦, 郑 磊, 等. 白细胞介素在溃疡性结肠炎中的作用[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2015, 24(1) : 4-7.

[20] Jovanovic M, Markovic B S, Gajovic N, *et al.* Metabolic syndrome attenuates ulcerative colitis: Correlation with interleukin-10 and galectin-3 expression [J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(43) : 6465-6482.

[21] Zhang F R, Zhao W, Zhou J, *et al.* Heat shock transcription factor 2 reduces the secretion of IL-1 β by inhibiting NLRP3 inflammasome activation in ulcerative colitis [J]. *Gene*, 2021, 768: 145299.

[22] Ranson N, Veldhuis M, Mitchell B, *et al.* NLRP3-dependent and -independent processing of interleukin (IL) -1 β in active ulcerative colitis[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 20(1) : 57.

[23] 沈 雁, 钟继红, 徐 磊, 等. 盐酸小檗碱对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-10 表达的影响[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(8) : 1094-1098.

[24] Kosler S, Strukelj B, Berlec A. Lactic acid bacteria with concomitant IL-17, IL-23 and TNF- α binding ability for the treatment of inflammatory bowel disease [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2017, 18(4) : 318-326.

[25] Kaur H, Gupta T, Kapila S, *et al.* Protective effects of potential probiotic *Lactobacillus rhamnosus* (MTCC-5897) fermented whey on reinforcement of intestinal epithelial barrier function in a colitis-induced murine model[J]. *Food Funct*, 2021, 12(13) : 6102-6116.

[26] 邱邦东, 臧 月, 王 生, 等. 鳖甲煎丸改善肠道菌群失调治疗大鼠非酒精性脂肪肝的机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(4) : 145-151.

[27] Qin H L, Zhang Z Z, Hang X M, *et al.* *L. plantarum* prevents *Enteroinvasive Escherichia coli*-induced tight junction proteins changes in intestinal epithelial cells[J]. *BMC Microbiol*, 2009, 9: 63.

[28] 孙必强, 周 英, 刘卫东, 等. 不同剂型七味白术散对腹泻小鼠肠道菌群失调和肠黏膜紧密连接蛋白的影响[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(12) : 2835-2837.

[29] 刘 涛, 孔维佳, 杨平常, 等. 鼻窦源性葡萄球菌肠毒素 B 在溃疡性结肠炎发病中的作用[J]. 山西医科大学学报, 2005, 36(6) : 693-696.

[30] 林梅英, 宋明辉, 杨美成, 等. 食品基质中不同金黄色葡萄球菌肠毒素基因型表达差异研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(17): 6751-6755.

[31] 周 双. 婴儿肠源乳酸菌对小鼠肠道免疫功能和菌群的影响[D]. 邯郸: 河北工程大学, 2020.

[32] 李海红, 杨振泉, 王晓霖, 等. 乳酸菌表面蛋白对免疫细

胞的诱导增殖及粘附抑制效应[J]. 中国微生态学杂志, 2016, 28(1): 15-20.

[33] Golowezyc M A, Mobili P, Garrote G L, et al. Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar enteritidis[J]. *Int J Food Microbiol*, 2007, 118(3): 264-273.

三拗汤对咳嗽变异性哮喘小鼠 Th17/Treg 免疫平衡的影响

肖愉箫¹, 张亚杰², 王 星^{1*}

(1. 中国药科大学药学院, 江苏 南京 211198; 2. 南京中医药大学附属南京中医院, 江苏 南京 210022)

摘要: **目的** 研究三拗汤对咳嗽变异性哮喘小鼠 Th17/Treg 免疫平衡的影响。**方法** 小鼠通过腹腔注射卵蛋白、氢氧化铝致敏, 并吸入卵蛋白激发法建立咳嗽变异性哮喘模型, 随机分为空白组, 模型组, 孟鲁司特钠组, 三拗汤低、中、高剂量组, HE、F4/80 荧光染色观察肺及支气管组织病理变化、巨噬细胞聚集情况, 流式细胞术分析脾脏组织 Th17、Treg 细胞比例, RT-qPCR 检测肺组织 *TGF-β*、*IL-6*、*IL-23*、*IL-10*、*IL-17A*、*IL-17F*、*IL-4*、*IL-13* mRNA 表达。**结果** 与模型组比较, 三拗汤各剂量组小鼠气管、支气管及血管周围炎性细胞浸润量减少, 杯状细胞化减轻, 上皮纤维化和平滑肌体积增加现象缓解, F4/80 荧光强度减弱; 肺组织 *TGF-β*、*IL-17A*、*IL-17F*、*IL-4*、*IL-6*、*IL-13* mRNA 表达降低 ($P<0.05$); 脾脏 Th17 细胞比例、Th17/Treg 比值降低 ($P<0.05$)。**结论** 三拗汤可改善咳嗽变异性哮喘小鼠气管及肺组织炎性病理变化及气道痉挛状态, 其机制与调节 Th17/Treg 免疫平衡及相关细胞因子有关。

关键词: 三拗汤; 咳嗽变异性哮喘; Th17/Treg 免疫平衡; F4/80

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)04-1300-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.04.046

咳嗽变异性哮喘是一种特殊类型的哮喘, 咳嗽为其唯一或主要临床表现, 表现为刺激性干咳, 程度剧烈, 以夜间咳嗽为主, 通常不伴有明显喘息、气促等症状, 感冒、冷空气、灰尘、油烟等原因可导致咳嗽加重^[1], 本病发生率近年来有上升趋势, 是慢性咳嗽 (尤其是儿童慢性咳嗽) 占比最高的疾病 (41.95%), 而且约 30% 可发展为典型哮喘^[2-3]。目前认为, 咳嗽变异性哮喘是由多种因素相互作用所致, 包括社会及环境、遗传、感染、免疫等, 以免疫因素为主, 大多数研究表明本病在病理生理学特征及相关的免疫-炎症反应机制方面与典型哮喘具有相似性^[4-5]。经典理论认为, Th1/Th2 比例失衡是哮喘发病的主要免疫机制, 但近年来大量的临床和基础研究发现, Th17/Treg 失衡也是重要机制^[6]。

中医将咳嗽变异性哮喘归属于“咳嗽”范畴, 属“风咳”“痉咳”等^[7]。国医大师王烈认为, 本病发病机制及特点与哮喘相似, 但又不同于哮喘的喘息气促之症, 因此

将其命名为“哮喘”^[8]。三拗汤出自《太平惠民和剂局方》, 由麻黄、杏仁、甘草组成, 具有宣肺散寒、止嗽平喘功效, 是历代治疗哮喘的经典方剂, 本研究观察该方对 Th17/Treg 细胞免疫平衡调控作用, 并进一步探讨其止咳平喘机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠 60 只, 体质量 18~22 g, 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (沪) 2018-0006, 实验前在标准实验室条件下饲养 1 周。

1.2 试剂与药物 三拗汤为实验室自制, 方法为取麻黄 6 g、杏仁 6 g、甘草 6 g, 加 10 倍量水浸泡后回流提取, 过滤后浓缩至 100 mL, 即得。孟鲁司特钠咀嚼片 (批号 S015289) 购自美国默沙东公司。卵清白蛋白 (ovalbumin, OVA) (批号 1002638270)、氢氧化铝 (批号 21645-51-2) 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 小鼠 Treg 细胞染色试剂盒

收稿日期: 2021-06-21

基金项目: 江苏省卫生健康委科研项目 (LGY2020021); 中国药科大学国家级大学生创新创业训练计划项目 (202110316010Z)

作者简介: 肖愉箫 (2001—), 女, 研究方向为药理学。Tel: 18994132009, E-mail: yuxiao1798@163.com

* 通信作者: 王 星 (1985—), 男, 博士, 讲师, 研究方向为中药药理学。Tel: 15365186608, E-mail: star10000@sina.com

网络出版日期: 2022-02-17

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20220217.1643.002.html>