

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2026.14.011

清肠温中方对有菌/伪无菌急性溃疡性结肠炎模型小鼠肠黏液屏障影响的比较研究

高明旭¹, 刘雷蕾², 路理杰¹, 王佳丽¹, 胡俊聪¹, 林杨哲¹,
刘骐瑞¹, 董玥¹, 王鲁越¹, 薛泽宇¹, 李军祥¹, 石磊[✉]

1. 北京中医药大学东方医院, 北京市丰台区方庄芳星园一区6号, 100078; 2. 北京中医药大学中医学院

[摘要] **目的** 探讨清肠温中方治疗急性溃疡性结肠炎(UC)的作用机制。**方法** 100只雄性C57BL/6J小鼠采用随机数字表法分为伪无菌组(45只)和有菌组(55只)。伪无菌组小鼠建立伪无菌鼠模型和急性UC模型,将造模成功的45只伪无菌急性UC模型小鼠再随机分为伪无菌模型组、伪无菌清肠温中方组、伪无菌美沙拉秦组各15只。55只有菌组小鼠再随机分为空白组(10只)及有菌模型组、有菌清肠温中方组、有菌美沙拉秦组各15只,除空白组外其余各组小鼠建立急性UC模型,空白组小鼠不做干预。实验第32天开始,伪无菌清肠温中方组、有菌清肠温中方组给予清肠温中方颗粒9.71 g/(kg·d)去离子水溶液灌胃,伪无菌美沙拉秦组、有菌美沙拉秦组给予美沙拉秦肠溶片151.67 mg/(kg·d)去离子水溶液灌胃,其余各组小鼠予去离子水0.1 ml/10 g灌胃,每日1次,共7天。实验第25天伪无菌组和有菌组随机选取6只小鼠检测体质量,并进行粪便肠道菌群16s rDNA测序,比较两组小鼠差异菌群的生物学信息[包括操作分类单元(OTUs)数量、香农(Shannon)指数、观测物种数(Observed_species)指数、系统发育多样性(PD whole tree)]。实验第39天,检测各组小鼠体质量,并进行疾病活动指数(DAI)评分;测量结肠长度、结肠湿重;HE染色观察结肠组织病理学,并进行结肠组织学病变评分;检测结肠组织黏液屏障指标黏多糖、黏蛋白2(MUC2)表达。**结果** 实验第25天,伪无菌组和有菌组小鼠体质量比较差异无统计学意义($P>0.05$);与有菌组比较,伪无菌组OTUs数量、Shannon指数、Observed_species指数、PD whole tree均显著降低($P<0.01$)。实验第39天,与空白组比较,有菌模型组小鼠体质量降低、DAI评分升高,结肠湿重增加、结肠长度降低,结肠组织学病变评分显著增加,黏多糖、MUC2表达降低($P<0.01$),而伪无菌模型组上述各指标差异均无统计学意义($P>0.05$)。与有菌模型组比较,有菌清肠温中方组上述各指标均显著改善,有菌美沙拉秦组仅DAI评分、结肠湿重降低($P<0.01$)。伪无菌模型组、伪无菌清肠温中方组、伪无菌美沙拉秦组小鼠各指标差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 清肠温中方可能通过调控肠道菌群促进肠黏膜屏障重建,从而发挥治疗急性UC的作用。

[关键词] 溃疡性结肠炎; 肠道菌群; 黏液屏障; 清肠温中方

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种慢性非特异性肠道炎症,具有复发率高、难治愈、随病程迁延易进展为结肠癌的特点,给临床治疗带来巨大挑战。近年研究^[1]证实,肠道菌群失调是

UC发病的驱动因素之一。健康人群肠道以拟杆菌门、厚壁菌门为主,而UC患者肠道有害菌富集、有益菌减少,导致黏液屏障破坏、炎症反应加剧。此外,肠道菌群与肠道黏液屏障的发育密切相关,黏液屏障中除了大部分凝胶状的黏液外,还有免疫球蛋白、抗菌肽等物质,它们能在肠黏膜抵御外源细菌和肠道固有微生物侵袭时发挥重要作用,尤其可以将肠上皮与肠道菌群分离,从而维持肠道微生

基金项目: 国家自然科学基金(82004113); 中央高水平中医医院临床科研业务费(DFGZRB-2024GJRC011); 中华中医药学会青年人才托举项目(2021-QNRC2-B06)

✉ 通信作者: b01350@bucm.edu.cn

态平衡^[2]。目前 UC 的西医治疗药物包括 5-氨基水杨酸、激素、免疫抑制剂和生物制剂等,但临床使用中存在骨髓抑制等副作用,且停药后易复发^[3]。课题组通过多年研究提出,脾胃虚寒、湿热瘀阻为慢性复发型 UC 的核心病机,并据此创立清肠温中方。临床研究提示,本方疗效确切,可有效改善 UC 临床症状、诱导临床缓解、促进黏膜愈合而维持 UC 的长期缓解及减少复发^[4-5]。动物实验亦证实,本方可以显著改善肠黏液分布和黏蛋白表达^[6]。但是,该药物是否可通过调节肠道菌群从而发挥影响肠道黏膜的作用尚未明确。伪无菌小鼠模型因其可模拟“菌群缺失”的病理状态,且操作简便、成本低于无菌小鼠,已成为探究“菌群-疾病-药物”互作的关键工具^[7]。因此,本研究拟建立并评价一种稳定的伪无菌小鼠模型,立足于肠道菌群和肠黏液屏障,通过对比清肠温中方对有菌和伪无菌 UC 模型小鼠的作用及药效机制的差异,揭示清肠温中方治疗 UC 的作用机制,为 UC 的中医治疗提供思路。实验通过北京中医药大学学术委员会实验动物伦理分委员会审查(批准号: BUCM-2019-11121)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级健康雄性 C57BL/6J 小鼠 100 只, 6~8 周龄, 体质量 (20±2) g, 购自斯贝福(北京)生物技术有限公司, 实验动物许可证号: SCXK(京)2019-0010。常规饲养于北京中医药大学 SPF 级动物房, 12 h 光照/黑夜循环, 温度 (22±2) °C, 湿度 50%~60%, 自由饮食饮水饲养。

1.2 药物

清肠温中方组成: 黄连 6 g, 炮姜 10 g, 青黛 3 g, 苦参 9 g, 三七 6 g, 煨木香 6 g, 地榆炭 15 g, 炙甘草 6 g。颗粒剂由华润三九医药股份有限公司提供, 以去离子水为溶剂溶解颗粒剂配制溶液, 含生药 9.71 g/ml, 在超声波清洗机中震荡 4~6 h, 随后过滤去渣, 于 4 °C 保存。

美沙拉秦肠溶片(莎尔福, 德国福克制药股份有限公司), 批号: H20150124, 规格: 0.5g/片。两性霉素 B(货号: 1397-89-3)、盐酸万古霉素(货号: 1404-93-9)、新霉素硫酸盐(货号: 1405-10-3)、甲硝唑(货号: 443-48-1)、氨苄青霉素钠(货号: 69-52-3), 上海麦克林生化科技有限公司。

1.3 主要试剂及仪器

葡聚糖硫酸钠(DSS, 批号: 0216011080),

美国 MP Biomedical 公司; 黏蛋白 2(MUC2) 抗体(批号: GB11344)、AB-PAS 染色试剂盒(批号: G1049), 武汉赛维尔生物科技有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒(批号: BCA1)、RIPA 总蛋白提取试剂盒(批号: R0278), 美国 Sigma 公司; 蛋白酶抑制剂(批号: 11697498001), 瑞士 Roche 公司; DMSO(批号: D-8370-100L), 北京索莱宝科技有限公司; DNA 提取试剂盒(批号: 12888)、高通量自动化 DNA 纯化试剂盒(批号: 51531), 德国 Qiagen 公司; 双链 DNA 荧光检测试剂盒(批号: Q32854), 赛默飞世尔科技公司; 改良型高保真热稳定 DNA 聚合酶(批号: R060B), 厦门特宝生物工程股份有限公司; HE 染液(批号: RY0456), 北京高嘉生物技术有限公司; 免疫荧光染色二抗(批号: SY0669-DX)、DAPI 染色液(批号: D8884), 北京诺博莱德科技有限公司。

电子天平(型号: MP200A), 上海精密科学仪器有限公司; 台式高速离心机(型号: Centrifuge 5418), 德国艾本德股份公司; PCR 仪(型号: 580BR10905)、化学发光成像系统(型号: Chemi Doc XRS+), 美国 Bio-Rad 公司; Bioanalyzer(型号: 2100), 安捷伦公司; 高通量自动化核酸纯化工作站(型号: QIAextractor SN 002358), 天根生化科技(北京)有限公司; 电泳仪(型号: HE-120), 赛默飞世尔科技公司; 凝胶成像仪(型号: 2500), 上海天能科技有限公司; 酶标仪(型号: ELx800), 美国 BioTek 公司; 高通量测序仪(型号: Illumina MiSeq), 美国 Illumina 公司; 荧光显微镜(型号: Nikon Eclipse C1), 日本尼康公司。

1.4 造模方法

伪无菌鼠模型建立^[8]: 将每日新鲜配制的两性霉素 B 1 mg/kg 加入伪无菌组小鼠饮用水中, 连续给药 24 天; 第 4 天开始, 在小鼠的饮用水中再加入盐酸万古霉素 50 mg/kg+新霉素硫酸盐 100 mg/kg+甲硝唑 100 mg/kg+氨苄青霉素钠 1 mg/kg, 共 21 天。

急性 UC 模型建立^[3]: 实验第 25~31 天, 除空白组外, 其余各组小鼠连续 7 天自由饮用 2.5% DSS 溶液。

1.5 分组及干预方法

100 只小鼠适应性饲养 1 周后进行分组。从随机数字表任意位置连续读取 100 个不重复随机数, 对应 100 个编号, 将 100 个随机数从小到大排序。前 45 个对应编号归入伪无菌组(45 只), 剩余 55 个归入有菌组(55 只)。伪无菌组小鼠建立伪无菌鼠

模型和急性 UC 模型, 将造模成功的 45 只伪无菌急性 UC 模型小鼠再随机分为伪无菌模型组 (15 只)、伪无菌清肠温中方组 (15 只)、伪无菌美沙拉秦组 (15 只)。55 只无菌组小鼠随机分为空白组 (10 只)、有菌模型组 (15 只)、有菌清肠温中方组 (15 只)、有菌美沙拉秦组 (15 只), 除空白组外其余各组小鼠建立急性 UC 模型, 空白组小鼠不干预。

实验第 32~38 天, 所有小鼠分别给予相应药物灌胃, 每日 1 次, 共 7 天。按人与小鼠间体表面积折算的等效剂量进行估算 (人的体重按 60 kg 计算, 小鼠用量为人的 9.1 倍)^[9]。伪无菌清肠温中方组、有菌清肠温中方组给予清肠温中方颗粒 9.71 g/(kg·d) 去离子水溶液灌胃, 伪无菌美沙拉秦组、有菌美沙拉秦组给予美沙拉秦肠溶片 151.67 mg/(kg·d) 去离子水溶液灌胃, 其余各组小鼠予去离子水 0.1 ml/10 g 灌胃。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 伪无菌模型的验证 实验第 25 天观察伪无菌组和有菌组小鼠精神、进食量等一般状态, 测量体质量。采用随机数字表法每组选取 6 只小鼠进行粪便肠道菌群 16S rDNA 测序, 差异菌群的生物学信息比较包括: 操作分类单元 (OTUs) 数量; Alpha 多样性分析 [含香农 (Shannon) 指数、观测物种数 (Observed_species) 指数和系统发育多样性 (PD whole tree)], 并进行 Wilcoxon 秩和检验、主成分分析 (PCoA)。

1.6.2 小鼠疾病活动指数 (DAI) 评分 实验第 39 天, 检测各组小鼠体质量, 并进行 DAI 评分^[10]评价疾病活动度。DAI 评分=(体质量下降率得分+便质得分+便潜血得分)÷3。1) 体质量下降率=(取材前一天体质量-取材前两天体质量)÷取材前一天体质量×100%。体质量无下降计 0 分; 下降率 1%~<5% 计 1 分; 下降率 5%~<10% 计 2 分; 下降率 10%~<15% 计 3 分; 下降率 ≥15% 计 4 分。2) 便质: 正常粪便计 0 分, 糊状稀软便计 2 分; 水样便计 4 分。3) 便潜血: 便潜血阴性计 0 分; 阳性 (颜色变紫) 计 2 分; 肉眼血便或便血计 4 分。

1.6.3 结肠长度、结肠湿重 各组小鼠经腹主动脉取血后处死。从肛门处将骨盆剪断, 从直肠开始到肠道膨隆处 (回盲部) 下端剪断, 量取结肠长度。在盛有碎冰的培养皿盖上, 轻柔迅速地用眼科剪将肠管沿纵轴剪开, 用棉花团将粪便移去, 迅速放于盛有滤纸的电子天平上进行结肠湿重的测量。将肠道分成 3 段 2 cm 左右标本, 靠近直肠处 1 块标

本在 4% 多聚甲醛溶液中固定至少 24 h, 其余 2 块标本分别置于两个冻存管中, 做好标记后于 -80 ℃ 保存。

1.6.4 HE 染色观察组织病理学 采用随机数字表法每组选择 5 只小鼠固定后的肠道标本, 经洗涤、修块、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、贴片、烤片后制成玻片。采用 HE 染液染色, 经脱蜡、水洗等步骤后封片。显微镜镜下观察并进行结肠组织学病变评分^[9], 包括杯状细胞数量、黏膜厚度、炎性细胞数量、黏膜下层炎性细胞浸润数量、黏膜结构破坏程度、上皮细胞溃疡面积百分比、隐窝脓肿数 7 项内容, 总分 0~16 分。得分越高, 表示病理损伤越严重。

1.6.5 结肠组织黏液屏障指标 1) 采用 AB-PAS 染液染色检测黏多糖含量。石蜡切片脱蜡至水, 加入 AB-PAS 染液中染色 15 min, 自来水洗至无色, 入 AB-PAS 染液 B 中酸化 15 min, 自来水洗后, 蒸馏水复洗 2 遍, 入 AB-PAS 染液 A (恢复室温) 避光染色 30 min, 流水冲洗 5 min, 脱水封片。显微镜下观察拍照, 应用 ImageJ v 20.0 软件分析图像, 选取阳性染色区域面积百分比进行统计分析。2) 免疫荧光检测 MUC2 表达。石蜡切片脱蜡至水, 微波炉抗原修复, 3% BSA 封闭 30 min, 滴加 MUC2 一抗 (1:500), 4 ℃ 孵育过夜。加入二抗 (1:100), 室温避光孵育 50 min。加 DAPI 染液, 室温避光染色 10 min, 加自发荧光淬灭剂 B 液孵育 5 min, 流水冲洗 10 min, 抗荧光淬灭封片剂封片。显微镜下观察拍照, 应用 ImageJ v 20.0 软件分析图像, 选取阳性染色区域面积百分比进行统计分析。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 方差齐的两两比较用 LSD 检验, 方差不齐的用 Tamhane's T_2 检验。非正态分布的计量资料以中位数和四分位数 [$M(P_{25}, P_{75})$] 表示, 两组间比较采用 Mann-whitney 秩和检验, 多组间比较采用 Kruskal-Wallis 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 伪无菌组与有菌组小鼠体质量、肠道菌群结构差异分析结果比较

实验第 25 天, 伪无菌组和有菌组小鼠均无死亡, 活动及精神状态无差异。伪无菌组和有菌组小

鼠体质量分别为 (25. 65±1. 01) g、(25. 41±0. 66) g，两组小鼠体质量比较差异无统计学意义 ($P>0. 05$)。表 1 示，与有菌组比较，伪无菌组 OTUs 数量、Shannon 指数、Observed_species 指数、PD whole tree 均显著降低 ($P<0. 01$)。Wilcoxon 秩和检验 (图 1a) 和主成分分析 (图 1b) 结果表明，有菌组小鼠肠道菌群组成较伪无菌组更加丰富，且菌群物种组成的均

匀程度更高，再次证明抗生素联用清除肠道菌群的方法可以成功建立肠道伪无菌小鼠。

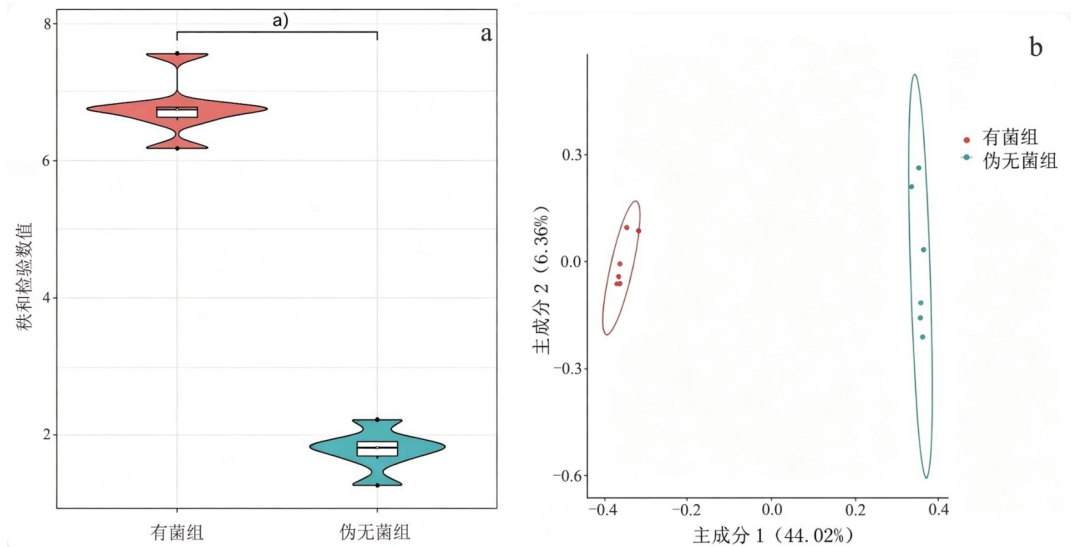
2. 2 药物干预后各组小鼠体质量及 DAI 评分比较

灌胃过程中，伪无菌模型组、有菌美沙拉秦组各死亡 4 只，伪无菌清肠温中方组、伪无菌美沙拉秦组、有菌清肠温中方组各死亡 3 只，有菌模型组死亡 5 只。表 2 示，与空白组比较，有菌模型组小

表 1 伪无菌组与有菌组小鼠肠道菌群结果比较

Table 1 Comparison of gut microbiota profiles between pseudo-germ-free and conventional mice (x̄±s)					
组别	鼠数	OTUs 数量	shannon 指数	Observed_species 指数	PD whole tree
伪无菌组	6	389. 83±23. 76 ^{a)}	1. 78±0. 32 ^{a)}	285. 18±14. 82 ^{a)}	16. 87±0. 65 ^{a)}
有菌组	6	2259. 50±201. 92	7. 65±0. 42	2236. 45±189. 37	60. 96±3. 87

注：OTUs，操作分类单元；Shannon 指数，香农指数；Observed_species 指数，观测物种数指数；PD whole tree，系统发育多样性。
a) 与有菌组比较， $P<0. 01$ 。



注：a，菌群多样性 Wilcoxon 秩和检验图；b，肠道菌群的主成分分析 (PCoA) 图。
a) $P<0. 01$ 。

图 1 伪无菌组和有菌组小鼠肠道菌群分析图

Figure 1 Gut microbiota analysis of mice in the pseudo-germ-free group and the conventional group

表 2 药物干预后各组小鼠体质量、DAI 评分比较

Table 2 Comparison of body weight and DAI scores among mice in each group after intervention [M (P ₂₅ , P ₇₅)]			
组别	鼠数	体质量/g	DAI 评分/分
空白组	10	30. 75 (29. 50, 31. 28)	0
伪无菌模型组	11	22. 80 (22. 50, 22. 90)	0. 00 (0. 00, 1. 50)
伪无菌清肠温中方组	12	23. 30 (22. 83, 23. 88)	0. 00 (0. 00, 1. 75)
伪无菌美沙拉秦组	12	23. 40 (22. 88, 23. 90)	0
有菌模型组	10	20. 35 (19. 90, 21. 23) ^{a)}	2. 00 (2. 00, 2. 00) ^{a)}
有菌清肠温中方组	12	24. 75 (24. 25, 25. 80) ^{b)}	0. 00 (0. 00, 2. 00) ^{b)}
有菌美沙拉秦组	11	23. 10 (22. 80, 23. 70)	0 ^{b)}

注：DAI，疾病活动指数。
a) 与空白组比较， $P<0. 01$ ；b) 与有菌模型组比较， $P<0. 01$ 。

鼠体质量降低、DAI评分升高 ($P<0.01$)，伪无菌模型组小鼠体质量及DAI评分差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。与有菌模型组比较，有菌清肠温中方组小鼠体质量增加，有菌清肠温中方组和有菌美沙拉秦组小鼠DAI评分均降低 ($P<0.01$)。伪无菌模型组、伪无菌清肠温中方组、伪无菌美沙拉秦组小鼠体质量及DAI评分比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.3 药物干预后各组小鼠结肠长度及结肠湿重比较

表3示，与空白组比较，有菌模型组小鼠结肠湿重增加、结肠长度降低 ($P<0.01$)，伪无菌模型组小鼠结肠长度及结肠湿重差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。与有菌模型组比较，有菌清肠温中方组和有菌美沙拉秦组小鼠结肠湿重均降低，有菌清肠温中方组结肠长度增加 ($P<0.01$)。伪无菌模型组、伪无菌清肠温中方组、伪无菌美沙拉秦组小鼠结肠长度及结肠湿重三组间比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.4 药物干预后各组小鼠结肠组织病理学比较

HE染色(图2、图3)示：空白组结肠黏膜四层结构清晰，空泡状杯状细胞丰富，无明显炎性细胞浸润，黏膜厚度正常。有菌模型组小鼠肠黏膜结构破坏明显，肠黏膜四层结构消失、变厚，杯状细胞明显减少，嗜中性粒细胞、淋巴细胞和少量嗜酸性粒细胞浸润。伪无菌模型组结肠组织病理学表现介于空白组和有菌模型组之间，未见明显溃疡和隐窝脓肿。伪无菌清肠温中方组、伪无菌美沙拉秦组结肠之间的组织病理学修复效果不明显，而有菌清肠温中方组和有菌美沙拉秦组结肠组织病变能够得到显著改善，其中有菌清肠温中方组结肠黏膜修复主要体现在增加杯状细胞数量、改善黏膜异常增厚、减少炎细胞浸润等。

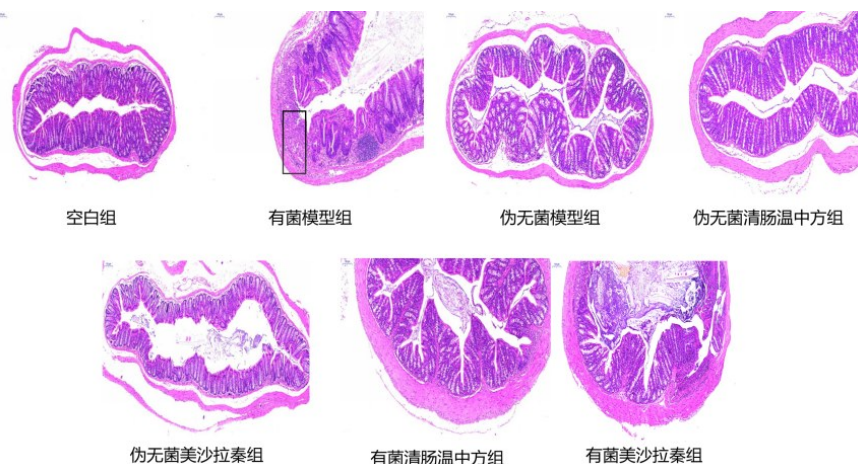
表4示，与空白组比较，有菌模型组结肠组织学病变评分显著增加 ($P<0.01$)，而伪无菌模型组结肠组织学病变评分差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与有菌模型组比较，有菌清肠温中方组结肠组织学病

表3 药物干预后各组小鼠结肠湿重、长度比较

Table 3 Comparison of colon wet weight and colon length in mice from each group after drug intervention [$M(P_{25}, P_{75})$]

组别	鼠数	结肠湿重/g	结肠长度/cm
空白组	10	0.79 (0.77, 0.83)	9.00 (7.88, 9.25)
伪无菌模型组	11	0.91 (0.85, 0.95)	6.80 (6.40, 6.90)
伪无菌清肠温中方组	12	0.91 (0.86, 0.99)	6.65 (6.35, 6.88)
伪无菌美沙拉秦组	12	0.94 (0.85, 1.04)	6.50 (5.20, 6.83)
有菌模型组	10	1.38 (1.34, 1.39) ^{a)}	5.55 (5.28, 5.73) ^{a)}
有菌清肠温中方组	12	0.88 (0.84, 0.93) ^{b)}	6.95 (6.65, 7.18) ^{b)}
有菌美沙拉秦组	11	0.91 (0.89, 0.95) ^{b)}	6.60 (6.30, 7.00)

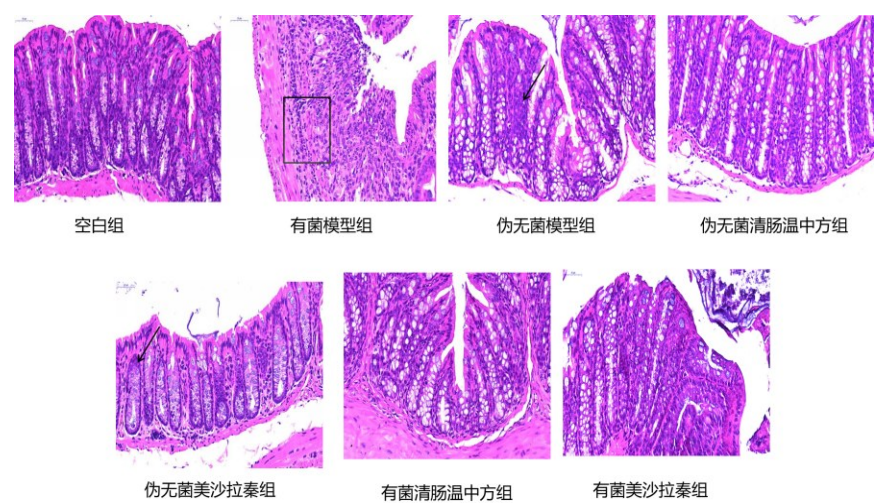
注：a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与有菌模型组比较， $P<0.01$ 。



注：黑框部分为隐窝、杯状细胞等结构消失。

图2 各组小鼠结肠组织病理图 (HE染色, ×100)

Figure 2 Histopathological images of colonic tissues in mice from each group (HE staining, ×100)



注：黑框部分为中性粒细胞在黏膜基层层浸润，部分可达黏膜下层；箭头示部分可见杯状细胞的破坏、消失。

图3 各组小鼠结肠组织学病变图（HE染色，×400）

Figure 3 Histopathological changes of colonic tissues in mice from each group (HE staining, ×400)

表4 药物干预后各组小鼠结肠组织学病变评分比较

Table 4 Comparison of histological injury scores of colonic tissues in mice from each group after drug intervention
[分, $M(P_{25}, P_{75})$]

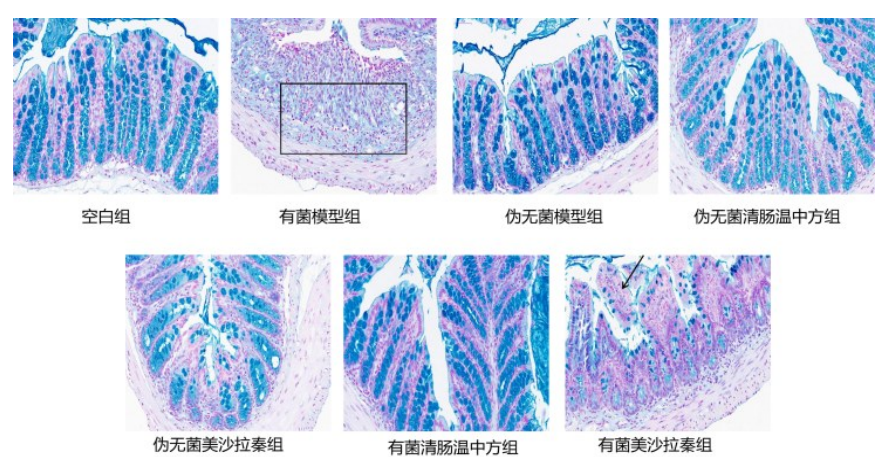
组别	鼠数	病变评分
空白组	5	0.00 (0.00, 0.14)
伪无菌模型组	5	0.14 (0.00, 0.61)
伪无菌清肠温中方组	5	0.14 (0.11, 0.36)
伪无菌美沙拉秦组	5	0.29 (0.14, 0.57)
有菌模型组	5	1.57 (1.32, 2.04) ^{a)}
有菌清肠温中方组	5	0.14 (0.00, 0.33) ^{b)}
有菌美沙拉秦组	5	0.79 (0.64, 0.90)

注：a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与有菌模型组比较, $P<0.01$ 。

变评分显著降低 ($P<0.01$), 有菌美沙拉秦组差异无统计学意义 ($P>0.05$)。伪无菌模型组、伪无菌清肠温中方组、伪无菌美沙拉秦组小鼠结肠组织学病变评分组间比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.5 药物干预后各组小鼠结肠组织黏多糖、MUC2水平比较

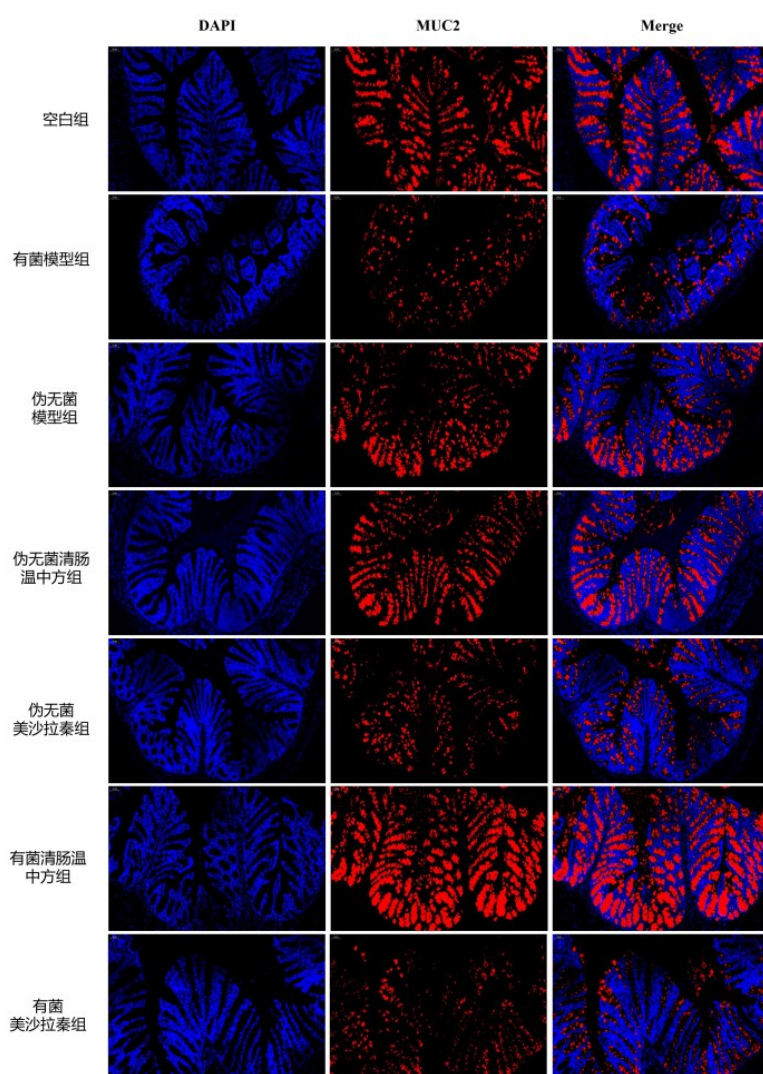
图4、图5示, 空白小鼠结肠黏膜中含有丰富的黏液、黏多糖和杯状细胞。与空白组比较, 有菌模型结肠炎小鼠的肠道黏液显著减少, 表现在数量减少、结构缺失, 黏多糖、MUC2阳性表达减少。伪无菌模型组黏液破坏, 黏多糖和MUC2表达量介于空白组和有菌模型组之间。有菌清肠温中方组肠



注：黑框部分为黏液结构缺失，杯状细胞数量显著下降；箭头所指处黏液相关结构缺失。

图4 药物干预后各组小鼠结肠组织黏多糖阿利新蓝染色图（×400）

Figure 4 Mucopolysaccharide expression in colonic tissues of mice in each group after drug intervention (Alcian blue staining, ×400)



注：MUC2，黏蛋白2；DAPI，4',6-二脒基-2-苯基吡啶；Merge 为前面的合并图。

图5 药物干预后各组小鼠结肠组织 MUC2 免疫荧光染色图 (×200)

Figure 5 Immunofluorescence staining of MUC2 expression in colonic tissues of mice in each group after drug intervention (×200)

道黏液数量、分布面积增加，黏多糖和 MUC2 阳性表达增加，肠道黏液更加完整。伪无菌清肠温中方组和伪无菌美沙拉秦组无明显改善。表 5 示，与空

白组比较，有菌模型组结肠黏多糖阳性染色面积百分比、MUC2 免疫荧光阳性染色面积百分比显著降低 ($P < 0.01$)，而伪无菌模型组结肠组织黏多糖

表 5 药物干预后各组小鼠结肠组织黏多糖、MUC2 阳性面积百分比比较

Table 5 Comparison of the percentage of positive area for mucopolysaccharide and MUC2 expression in colonic tissues of mice in each group after drug intervention [%, $M (P_{25}, P_{75})$]

组别	鼠数	黏多糖	MUC2
空白组	10	25.36 (23.58, 27.92)	17.20 (13.70, 19.36)
伪无菌模型组	11	19.82 (16.90, 20.47)	9.53 (8.55, 11.16)
伪无菌清肠温中方组	12	22.10 (19.99, 23.58)	12.66 (10.60, 14.60)
伪无菌美沙拉秦组	12	18.83 (16.36, 20.36)	7.19 (6.51, 8.11)
有菌模型组	10	5.87 (4.15, 6.59) ^{a)}	4.83 (3.37, 6.72) ^{a)}
有菌清肠温中方组	12	24.53 (21.49, 26.66) ^{b)}	17.08 (13.58, 18.31) ^{b)}
有菌美沙拉秦组	11	13.77 (12.60, 17.03)	8.48 (7.04, 9.70)

注：MUC2，黏蛋白2。

a) 与空白组比较， $P < 0.01$ ；b) 与有菌模型组比较， $P < 0.01$ 。

阳性染色面积、MUC2免疫荧光阳性染色面积差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与有菌模型组比较,有菌清肠温中方组结肠组织黏多糖阳性染色面积、MUC2免疫荧光阳性染色面积增加 ($P<0.01$),有菌美沙拉秦组差异无统计学意义 ($P>0.05$)。伪无菌模型组、伪无菌清肠温中方组、伪无菌美沙拉秦组小鼠结肠组织黏多糖阳性染色面积、MUC2免疫荧光阳性染色面积组间比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

3 讨论

中医学认为,UC当属“肠澼”“久痢”范畴,本病病位在肠,与脾胃关系密切。病因病机为外感湿热之邪,或饮食不节,脾胃受伤;或情志不畅,恼怒伤肝,肝气犯脾;或郁思伤脾,日久导致脾胃虚弱。运化失司,水湿内停,湿郁化热,湿热内蕴,湿热与肠道气血相搏结,气血凝滞,化为脓血,故患者出现腹泻,下利黏液脓血便。肠道传导失司,气机阻滞,腑气不通,故见腹痛,里急后重。脾胃虚弱,脾阳不足,温煦失职,表现为腹部冷痛,受寒即发,遇寒加重。本病活动期病机多属湿热蕴肠、气血不调;缓解期多属脾虚湿蕴、运化失健。治疗多以清热化湿、调气和血或健脾益气、化湿和中为主^[11]。本团队总结多年经验,提出急性UC寒热错杂、湿热瘀阻病机,并创立了清肠温中方^[12]。方中黄连清热燥湿、泻火解毒,炮姜温中散寒、温经止血,二药合用为君,具有清热燥湿、温脾止泻等功效。苦参清热燥湿,三七化瘀止血、活血定痛,青黛清热解毒、凉血消斑,三药合用为臣,在增强君药清热燥湿作用的同时,兼能化瘀止血。木香行气止痛、健脾调中,地榆炭凉血止血、解毒敛疮,二药佐以行气导滞、凉血止血。炙甘草补脾益气、调和诸药,为使药。诸药合用,共奏温中健脾、清热化瘀的功效。团队前期研究结果^[13-14]显示,清肠温中方对轻中度UC患者临床症状、黏膜病变均有明显改善作用,且能有效减少UC患者肠道黏蛋白MUC2表达,促进黏液分泌和再分布,有效修复黏液。基础研究^[5, 15]发现,清肠温中方可以显著抑制UC模型动物的肠上皮过度凋亡、减少氧化应激带来的过度损伤,抑制炎症并能有效修复多种紧密连接复合体结构功能,同时还能调节肠道菌群和代谢物,从多靶点多途径治疗UC。

肠道菌群与代谢性疾病、炎症性肠病等疾病有密切联系^[16-17],通过益生菌等手段恢复和重建正常的肠道菌群,对多种疾病均显示出良好的治疗效

果^[18]。但肠道微生物不仅数量庞大,分布情况和结构组成复杂,肠道微生物对许多疾病的影响及其机制仍不清楚。因此,本研究采用多种抗生素联用的方法制备伪无菌鼠,通过肠道菌群测序技术证实了伪无菌鼠的成功建立。本研究结果显示,多种抗生素联用的方法制备伪无菌鼠对小鼠的体质量和进食量等一般生理状态无影响,但有菌模型小鼠较伪无菌模型小鼠OTUs数量、Shannon指数、Observed_species指数、PD whole tree均显著升高。与空白组比较,药物干预后有菌模型组小鼠体质量降低、DAI评分升高,结肠湿重增加、结肠长度降低,结肠组织肠黏膜结构破坏明显,病理损伤严重;而伪无菌模型组小鼠上述指标与空白组无显著差异,病理损伤介于空白组和有菌模型组之间,说明肠道中有菌和伪无菌状态会影响急性UC病情的严重程度。另外,经清肠温中方干预有菌模型小鼠后可以有效提高小鼠体质量、缓解小鼠的疾病活动度、增加结肠长度、降低结肠湿重,改善结肠的组织学病变,促进受损黏膜的结构修复,减少炎症细胞过度浸润从而发挥疗效,而针对伪无菌UC小鼠清肠温中方和美沙拉秦肠溶片干预未见效果。美沙拉秦肠溶片仅能降低有菌急性UC小鼠DAI评分、结肠湿重,对其他指标改善不显著,提示清肠温中方对有菌小鼠的作用可能优于美沙拉秦肠溶片,这仍需进一步研究证实。

肠黏膜具有屏障功能,主要包括化学(黏液)屏障、机械屏障、生物屏障和免疫屏障,完整的黏液屏障是保护肠道的第一道屏障^[19]。黏液由黏多糖、水、电解质、脂质、蛋白质和其他成分组成,特定的黏液蛋白被称为MUC,是黏液中存在的主要结构和功能成分^[20]。当各种致病因素刺激和破坏肠上皮细胞时,会出现杯状细胞丢失、黏液减少、黏液层中断,从而破坏了黏液屏障。急性UC时,杯状细胞分泌的黏蛋白数量少且呈现低硫酸化,这一改变会削弱黏膜抗细菌侵袭的能力,从而加重病情^[21]。伪无菌UC小鼠结肠组织中黏多糖、MUC2蛋白的表达与空白组比较差异无统计学意义,但有菌UC小鼠结肠组织黏多糖、MUC2表达显著减少,说明肠道菌群可以影响黏液屏障状态,进而最终影响UC疾病的严重程度。本研究通过阿利新蓝染色发现,UC小鼠肠黏膜中黏液明显丢失,黏液层不连贯;免疫荧光染色发现MUC2表达明显减少。而经过清肠温中方治疗后,可以有效提高MUC2、黏多糖的表达,促进黏液的分布和黏液的

完整性,重建黏液屏障。同时,美沙拉秦肠溶片对有菌 UC 小鼠结肠组织黏多糖、MUC2 的表达无显著影响。

综上所述,肠道中有菌或伪无菌状态不仅可以影响 UC 病情的严重程度,还会对药物的作用产生影响。与肠道伪无菌状态相比,清肠温中方对有菌 UC 小鼠的干预效果优于对伪无菌 UC 小鼠的干预效果,主要表现在可以有效减轻有菌 UC 小鼠肠道的炎症程度和疾病活动度,改善肠道黏膜的组织学结构,促进黏蛋白的表达和黏液的分布,修复受损的肠黏膜,重建黏液屏障。虽然美沙拉秦肠溶片和清肠温中方都能有效改善肠道炎症与黏液状态,但清肠温中方具有更好的治疗趋势。此外,本研究缺少菌群移植验证的环节,后续将继续补充相关内容,以进一步提高实验的科学性。

参考文献

- [1]李文彬,李景南. 肠道菌群与溃疡性结肠炎癌变的研究进展[J]. 中华消化杂志, 2017, 37(5): 353-355.
- [2]黄春兰,曾悦. 杯状细胞及肠道黏液屏障的功能研究[J]. 国际消化病杂志, 2017, 37(6): 357-360.
- [3]Wang J L, Han X, Li J X, et al. Differential analysis of intestinal microbiota and metabolites in mice with dextran sulfate sodium-induced colitis[J]. World J Gastroenterol, 2022, 28(43): 6109-6130.
- [4]Cheng Y, Li J, Zhang X, et al. Protective effect of Qingchang Wenzhong Decoction on colitis and colitis-related carcinogenesis by regulating inflammation and intestinal fibrosis[J]. J Inflamm Res, 2023, 16: 1479-1495. DOI: 10. 2147/ jir. s402395.
- [5]Zhang Y, Li J, Han X, et al. Qingchang Wenzhong Decoction ameliorates intestinal inflammation and intestinal barrier dysfunction in ulcerative colitis via the GC-C signaling pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 322: 117503. DOI: 10. 1016/j. jep. 2023. 117503.
- [6]张阳,李军祥,胡俊聪,等. 清肠温中方对溃疡性结肠炎小鼠 NLRP6/IL-18/MUC2 轴及肠道黏液屏障的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2023, 30(9): 96-101.
- [7]涂师运,王娟,傅金凤,等. 无菌小鼠在肠道菌群研究中的应用概述[J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(2): 356-362.
- [8]Reikvam D H, Erofeev A, Sandvik A, et al. Depletion of murine intestinal microbiota: effects on gut mucosa and epithelial gene expression[J]. PLoS One, 2011, 6(3): e17996.
- [9]徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2002: 18-20.
- [10]Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, et al. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice[J]. Gastroenterology, 1990, 98(3): 694-702.
- [11]中华中医药学会《溃疡性结肠炎中医诊疗指南》项目组. 溃疡性结肠炎中医诊疗指南(2023)[J]. 中医杂志, 2024, 65(7): 763-768.
- [12]张阳,李军祥,石磊. 基于玄府理论辨治溃疡性结肠炎[J]. 中国中医药信息杂志, 2023, 30(2): 148-151.
- [13]王志斌,陈晨,郭一,等. 清肠温中方治疗轻中度溃疡性结肠炎的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(1): 15-19.
- [14]韩啸,李军祥,陈晓伟,等. 清肠温中方对溃疡性结肠炎患者黏膜屏障功能的调控作用研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2022, 30(10): 713-718.
- [15]Sun Z, Pei W, Guo Y, et al. Gut Microbiota-mediated NLRP12 expression drives the attenuation of dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis by Qingchang Wenzhong Decoction[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019: 9839474. DOI: 10. 1155/2019/9839474.
- [16]邹步,唐莹,杨文玲,等. 肠道菌群-FXR 轴在代谢性疾病中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(9): 1716-1720.
- [17]Marchesi J R, Adams D H, Fava F, et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier[J]. Gut, 2016, 65(2): 330-339.
- [18]徐珍妮,欧静,黄灵潇,等. 肠道菌群对小鼠放射敏感组织稳态维持和再生修复的影响[J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(20): 1978-1986.
- [19]Paone P, Cani P D. Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners?[J]. Gut, 2020, 69(12): 2232-2243.
- [20]Bansil R, Turner B S. The biology of mucus: composition, synthesis and organization[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2018, 124: 3-15. DOI: 10. 1016/j. addr. 2017. 09. 023.
- [21]庄肇朦,吕宾. 溃疡性结肠炎肠黏膜屏障损伤及其相关机制研究进展[J]. 胃肠病学, 2012, 17(8): 506-508.

Comparative Study on the Effects of *Qingchang Wenzhong Decoction* (清肠温中方) on the Intestinal Mucus Barrier in Conventional and Pseudo-Germ-Free Model Mice of Acute Ulcerative Colitis

GAO Mingxu¹, LIU Leilei², LU Lijie¹, WANG Jiali¹, HU Juncong¹, LIN Yangzhe¹, LIU Qirui¹, DONG Yue¹, WANG Luyue¹, XUE Zeyu¹, LI Junxiang¹, SHI Lei¹

1. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100078; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine

ABSTRACT **Objective** To explore the mechanisms of *Qingchang Wenzhong Decoction* (清肠温中方, QWD) in treating ulcerative colitis (UC). **Methods** A total of 100 male C57BL/6J mice were assigned to a pseudo-germ-free group (n=45) and a conventional group (n=55) using a random number table. Pseudo-germ-free model was established by giving antibiotic treatment and subsequently subjected to acute UC induction. After the model was successfully established, the 45 pseudo-germ-free acute UC mice were randomly allocated to a pseudo-germ-free model group, a pseudo-germ-free QWD group, and a pseudo-germ-free mesalazine group, with 15 mice in each group. The 55 conventional mice were randomly divided into a normal control group (n=10), as well as a conventional model group, a conventional QWD group, and a conventional mesalazine group, with 15 mice in each group. Except for the normal control group, acute UC models were established in all other groups. Mice in the control group received no intervention. From day 32 of the experiment, mice in the pseudo-germ-free QWD group and the conventional QWD group were administered with QWD granules at a dose of 9.71 g/(kg·d) by gavage with deionized water, while those in the pseudo-germ-free mesalazine group and the conventional mesalazine group were given mesalazine enteric-coated tablets at a dose of 151.67 mg/(kg·d) by gavage. Mice in the remaining groups received an equal volume of deionized water once daily for 7 consecutive days. On day 25 of the experiment, six mice were randomly selected from both the pseudo-germ-free group and the conventional group to measure body weight, and fecal samples were collected for 16S rDNA sequencing to compare differences in gut microbiota, including operational taxonomic units (OTUs), Shannon index, Observed_species index, and phylogenetic diversity (PD whole tree). On day 39, body weight was measured in all groups, and the disease activity index (DAI) was evaluated. Colon length and colon wet weight were recorded. Histopathological changes in colonic tissues were assessed by hematoxylin and eosin (HE) staining, and histological injury scores were determined. In addition, the expression levels of mucopolysaccharides and mucin 2 (MUC2) in colonic tissues were measured. **Results** On day 25, there was no significant difference in body weight between the pseudo-germ-free group and the conventional microbiota group ($P>0.05$). Compared to the conventional microbiota group, the pseudo-germ-free group showed significantly reduced OTUs, Shannon index, Observed_species index, and PD whole tree ($P<0.01$). On day 39, compared to the normal control group, mice in the conventional model group showed a significant decrease in the body weight and an increase in DAI, along with increased colon wet weight, shortened colon length, markedly elevated histopathological scores, and reduced expression of mucopolysaccharides and MUC2 ($P<0.01$). In contrast, no significant differences were observed in these parameters in the pseudo-germ-free model group ($P>0.05$). Compared to the conventional model group, the conventional QWD group showed significant improvement in all measured parameters, whereas the conventional mesalazine group showed reductions only in DAI scores and colon wet weight ($P<0.01$). No statistically significant differences were observed among the pseudo-germ-free model group, the pseudo-germ-free QWD group, and the pseudo-germ-free mesalazine group ($P>0.05$). **Conclusion** QWD may promote the reconstruction of the intestinal mucus barrier by regulating the intestinal flora, thereby exerting a therapeutic effect on acute UC.

Keywords ulcerative colitis; gut microbiota; mucus barrier; *Qingchang Wenzhong Decoction* (清肠温中方)

(收稿日期: 2025-12-14; 录用日期: 2026-01-19; 修回日期: 2026-04-29)

[编辑: 邓媛]