

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.19.016

化瘀通阳方对溃疡性结肠炎模型大鼠肠道菌群和氨基酸代谢的影响

施丽婕^{*}, 刘苏仪¹, 于潇¹, 陈杨², 杨洁¹, 王静¹, 刘雷蕾³, 何俗非⁴

1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津市西青区李七庄街昌凌路 88 号, 300380; 2. 浙江省平湖市中医院; 3. 北京中医药大学; 4. 天津中医药大学

摘要 目的 探讨化瘀通阳方治疗溃疡性结肠炎 (UC) 的可能作用机制。方法 24 只 Wistar 大鼠随机分为空白组 8 只和模型复制组 16 只。模型复制组采用 5% 葡聚糖硫酸钠 (DSS) 溶液诱导 UC 大鼠模型。造模成功的 10 只大鼠随机分为化瘀通阳组和模型组, 每组 5 只。化瘀通阳组予浓度为 0.54 g/ml 化瘀通阳方 2 ml 保留灌肠, 空白组和模型组大鼠用等量的生理盐水灌肠, 连续 10 天。干预结束后观察结肠组织病理, 并采集大鼠粪便, 进行肠道菌群宏基因组测序分析。结果 模型组大鼠结肠黏膜充血水肿, 结构紊乱, 黏膜下层可见炎性细胞浸润; 化瘀通阳组大鼠结肠黏膜结构恢复正常, 可见个别炎性细胞浸润, 腺体增生活跃。与空白组比较, 模型组大鼠结肠组织损伤指数 (TDI) 评分升高、属水平和种水平普雷沃氏菌属减少 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 化瘀通阳组大鼠结肠 TDI 评分降低、属水平普雷沃氏菌属及种水平鼠乳杆菌增加、苯丙氨酸降解减少、赖氨酸生物合成增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。Lefse 分析模型组差异菌为梭菌属、*Turicibacter*、*Faecalibaculum*, 化瘀通阳组差异菌群主要为乳杆菌属和 *Akkermansia*。结论 化瘀通阳方可以促进 UC 大鼠肠黏膜愈合, 调节肠道菌群的丰度变化, 其机制可能与乳杆菌属和 *Akkermansia* 的富集有关。

关键词 溃疡性结肠炎; 化瘀通阳方; 肠道菌群; 氨基酸代谢; 宏基因组

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种累及直肠甚至结肠的慢性炎症性疾病, 其发病机制涉及遗传易感性、黏膜屏障缺陷、免疫应答失调及环境因素影响等^[1]。目前认为, 易感基因背景下肠道菌群在 UC 发病中起核心作用^[2]。肠道微生物群是人体内最大的微生物群体, 能够调节胃肠蠕动, 参与营养物质的代谢, 维持防御系统的稳定等, 是肠道屏障的重要组成部分^[3-4]。有研究发现, 蛋白质的摄入和代谢与 UC 的发病密切相关, 摄入过多蛋白质、红肉及其制品与 UC 的复发显著相关^[5], 通过补充某些氨基酸可促进肠黏膜愈合^[6]。肠道菌群利用饮食中未分解的蛋白质产生一系列可能对宿主有益或有害的代谢产物。有益菌与致病菌失衡会造成氨基酸代谢失调, 其代谢产物由于失去黏膜屏障的监管而触发持续且无抑制的炎症反应, 进而导致 UC 的发生^[7-8]。

我们从中医正邪理论出发, 结合临床经验认

为, 溃疡性结肠炎是由于卫阳郁滞、瘀阻肠络所致, 创立了具有宣通卫阳、活血化瘀的化瘀通阳方, 并取得了较好的疗效^[9-11]。卫阳布散于脏腑之表, 行防御、保护之功, 与西医中肠道屏障的作用相似。研究^[12-14]发现, 化瘀通阳方可改善 UC 大鼠肠黏膜通透性, 增加结肠 Occludin 蛋白的表达, 改善肠上皮细胞间紧密连接状态。同时课题组通过 16S rDNA 测序, 发现化瘀通阳方可调节 UC 大鼠菌群, 改善菌群多样性, 增加肠道有益菌, 减少致病菌^[15]。宏基因组测序能进一步将肠道菌群注释到种水平, 具有较高的物种鉴定优势^[16], 故本研究基于宏基因组测序技术, 探究化瘀通阳方对 UC 大鼠肠道菌群的影响。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 24 只, 8 周龄, 体重 170 ~ 190 g, 实验动物合格证号: SCXK (京) 2016-0006, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 饲养温度 (24 ± 1) °C, 湿度 (45 ±

基金项目: 天津市科技计划项目 (17YFZCSY00860)

* 通讯作者: slj629@163.com

15) %。实验开始前进行 2 天适应性饲养。

1.2 主要药品与试剂

化癥通阳方由蒲黄 10 g (产地: 山东, 批号: 1312032)、醋五灵脂 10 g (产地: 陕西, 批号: 1309128)、薤白 10 g (产地: 广西, 批号: 1310101) 组成, 由天津中医药大学第一附属医院药剂科提供, 按照中药常规煎煮法: 将药物首先浸泡 30 min, 共煎煮 2 次, 第一煎 30 min, 第二煎 20 min, 将 2 煎药汁混合。将其制成浓度为 0.54 g/ml, 相当于含生药 2.7 g/kg, 放置于 4℃ 冰箱保存。葡聚糖硫酸钠 (DSS), 美国 MP 公司, 批号: 18008540530。苏木素-伊红 (HE) 染色液, 南昌雨露实验器材有限公司, 批号: 181001。甲醛, 浙江金华同和生物科技有限公司, 批号: 18082401。

1.3 实验仪器

EG1150H 型包埋机、RM2245 型切片机, 德国莱卡公司; Excelsior ES 型脱水机 (美国赛默飞公司); CX31 型显微镜 (日本奥林巴斯公司); Qubit® 2.0 Fluorometer 型荧光定量仪、Covaris S220 型超声波破碎仪、Agilent 2100 型生物分析仪、Illumina-HiSeq 测序平台, 北京诺禾致源生物信息科技有限公司。

1.4 动物分组、造模及给药

采用随机数字表法将 24 只 Wistar 大鼠分为空白组 8 只, 模型复制组 16 只。模型复制组参照文献 [7] 建立 UC 模型, 大鼠自由饮用 5% DSS 溶液, 同时每日早晨用 4 ml 新鲜的 5% DSS 溶液灌胃。空白组大鼠饮用生理盐水。造模共 7 天, 期间模型复制组大鼠死亡 2 只。造模结束后空白组和模型复制组采用随机数字表法各取 4 只大鼠, 观察肠组织病理, 以正常四层结构紊乱、隐窝消失、杯状细胞丢失、黏膜下层可见大量炎细胞浸润为造模成功 [8]。

将造模成功的 10 只大鼠采用随机数字表法分为化癥通阳组和模型组, 每组 5 只。化癥通阳组予化癥通阳方 2 ml 保留灌肠。模型组和空白组予 2 ml 生理盐水保留灌肠。各组均连续灌肠 10 天。

1.5 取材

采用随机数字表法每组各取 3 只大鼠, 肛周消毒后, 采用腹部按摩法收集粪便, 标记后立即置于冰上分装, 然后截取样品中段里部, 以减少外界环境对样本的干扰, 用灭菌冻存管分装 3 管, 每管 1~2 g, 并立即置于 -80℃ 保存, 以待后续宏基因检测。粪便取材完成后, 采用脱颈椎法处死各组大鼠, 沿腹中线剖开大鼠腹腔, 剖取 1~2 cm 肠管,

于 4% 中性甲醛中固定, 用于结肠病理观察。

1.6 宏基因组组装

使用 Readfq (v8, <https://github.com/cjfields/readfq>) 对 Illumina-HiSeq 测序平台获得的原始数据进行预处理, 获取用于后续分析的有效数据。各样品有效率 (有效数据比原始数据的百分比) 均在 98% 以上, 说明样品有效, 无污染。使用 SOAPdenovo 软件 (v2.04, <http://soap.genomics.org.cn/soapdenovo.html>) 对有效数据进行组装分析得到基因组骨架。将基因组骨架从 N 连接处打断, 得到支架内连续序列。

1.7 基因预测和丰度分析

使用 MetaGeneMark (V2.10, <http://topaz.gatech.edu/GeneMark/>) 对支架内连续序列 (≥ 500 bp) 进行开放阅读框 (ORF) 预测。采用 CD-HIT 软件 (V4.5.8, <http://www.bioinformatics.org/cd-hit/>) 进行去冗余。使用 Bowtie2 (Bowtie2.2.4 <http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>) 将各样品的有效数据比对至初始基因目录, 获得最终的非重复序列。

1.8 观察指标及方法

1.8.1 大鼠一般情况 主要观察大鼠的精神状态、毛发色泽、饮食及体重变化、大便性状等。

1.8.2 大鼠结肠病理 用结肠组织损伤指数 (tissues damage index, TDI) 评分 [9] 评价治疗效果。肠组织于 4% 中性甲醛中固定 24 h 后, 在流动清水下冲洗 10 min 至无甲醛气味, 脱水后将肠组织浸蜡 2.5 h, 用切片机将石蜡包埋后的肠组织制成厚 4 μ m 的连续石蜡切片, 最后用 HE 染色固定, 于显微镜下观察。

1.8.3 肠道菌群物种分析 1) 使用 DIAMOND 软件 (v0.9.9.110, <https://github.com/bbuchfink/diamond/>) 将非重复序列与 NR 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中的细菌序列进行比对, 取 E 值 $\leq 1 \times 10^{-5}$; 2) 选取 E 值 ≤ 10 倍最小 E 值的结果, 采取 LCA 算法来确定该序列的物种注释信息; 3) 从物种注释结果及基因丰度表中, 可以获得各个样品在各个分类层级 (界门纲目科属种) 上的物种相对丰度表, 并进行菌群结构和差异物种分析。

1.8.4 肠道菌群功能分析 1) 使用 DIAMOND 软件 (v0.9.9.110, <https://github.com/bbuchfink/diamond/>) 将非重复序列与 KEGG (<http://www.kegg.jp/kegg/>) 数据库进行比对; 2) 统计不同功能层级的相对丰度 (各功能层级的相对丰度等于注释为该功能层级的基因的相对丰度之和);

3) 利用各个分类层级上的相对丰度表, 进行主要功能分析。

1.9 统计学方法

数据采用 SPSS 22.0 软件进行分析, 若方差齐, 组间比较采用单因素方差分析; 若方差不齐, 组间比较采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。多样性采用主坐标分析 (PCoA, principal co-ordinates analysis), 基于 Bray-Curtis 距离并选取贡献率最大的主坐标组合进行作图展示。组间差异物种采用 LEfSe 分析, 首先, 通过非参数因子 Kruskal-Wallis 秩和检验检测组间的差异物种; 其次, 利用 Wilcoxon 秩和检验检查在显著差异物种类中的所有亚种比较是否都趋同于同一分类级别; 最后, 用线性判别分析 (LDA) 进行降维并评估差异物种的影响大小 (即 LDA 值), 展示 LDA 值 > 4 的物种。

2 结果

2.1 各组大鼠一般状况

空白组大鼠精神状态良好, 善动喜食, 毛发顺亮, 体重渐增, 大便正常; 模型组大鼠精神萎靡, 毛发枯萎, 喜静, 少饮少食, 体重降低, 出现稀水样便甚至脓血便; 化癥通阳组大鼠给药后精神状态逐渐好转, 饮食量及体重逐渐增加, 便血情况好转。

2.2 各组大鼠结肠黏膜病理结果

图 1 示, 空白组大鼠结肠黏膜四层结构完整, 无炎细胞浸润。模型组大鼠结肠黏膜充血水肿, 正常四层结构紊乱, 隐窝消失, 未见杯状细胞, 黏膜下层可见炎性细胞浸润。化癥通阳组大鼠结肠黏膜结构恢复正常, 可见个别炎性细胞浸润, 腺体增生活跃。表 1 示, 与空白组比较, 模型组大鼠结肠 TDI 评分明显升高 ($P < 0.01$), 化癥通阳组 TDI 评分差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与模型组比较, 化癥通阳组大鼠 TDI 评分明显降低 ($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠结肠组织损伤指数 (TDI) 评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TDI 评分
空白组	3	0.33 ± 0.577
模型组	3	$5.67 \pm 0.577^*$
化癥通阳组	3	$1.33 \pm 0.577^\Delta$

注: 与空白组比较, $* P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

2.3 各组大鼠肠道菌群分布比较

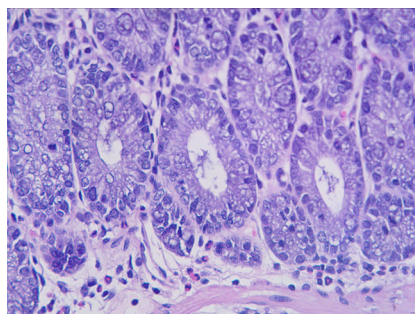
肠道菌群在宿主体内是稳定且复杂的, 但会受到外界环境的影响。图 2 示, 空白组 3 只大鼠的菌群相似。模型组大鼠肠道菌群由于 DSS 的影响, 其 3 个样品间菌群差异程度较大。化癥通阳组中 3 个样品间的菌群差异减小, 但是 3 组之间的菌群明显不同。

菌种组成是鉴别不同菌落类型的基本特征。通过研究属水平丰度排名前十的优势物种, 表 2 示, 各组间拟杆菌属、乳杆菌属的相对丰度比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 模型组普雷沃氏菌属相对丰度较空白组明显降低 ($P < 0.01$), 化癥通阳组普雷沃氏菌属相对丰度较模型组明显增高 ($P < 0.05$)。

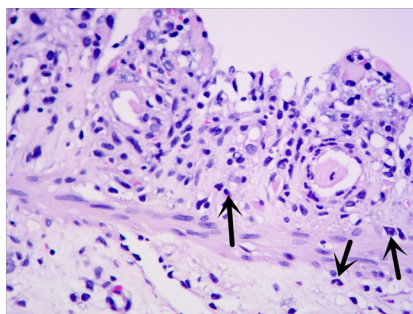
种水平丰度排名前十的优势物种, 表 3 示, 其中各组间拟杆菌、毛螺科菌的相对丰度变化差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 模型组鼠乳杆菌与空白组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 化癥通阳组鼠乳杆菌相对丰度较模型组明显升高 ($P < 0.01$); 模型组普雷沃氏菌相对丰度较空白组降低 ($P < 0.01$), 化癥通阳组普雷沃氏菌与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 各组大鼠肠道菌群差异物种分析结果

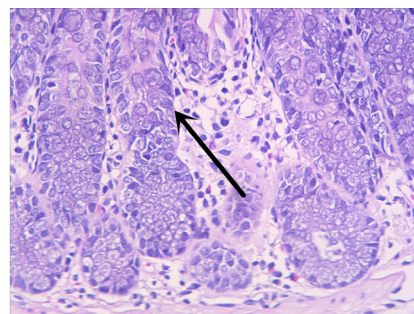
为进一步寻找影响各组菌群组间比较后具有统计学意义的差异物种, 通过 LEfSe 分析共筛选出 51 种差异菌。通过分析各组属水平差异物种, 空白组



空白组

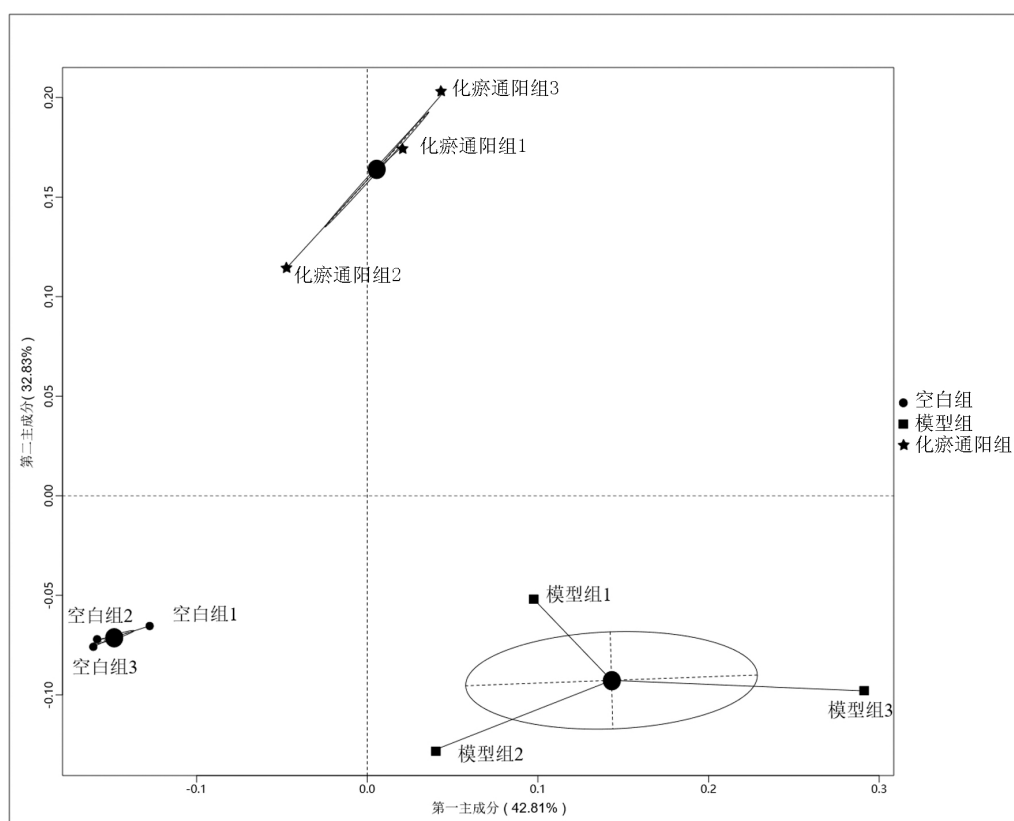


模型组



化癥通阳组

图 1 各组大鼠结肠病理结果 (HE, $\times 400$)



注：横坐标、纵坐标百分比表示主成分对样品差异的贡献值，点与点之间的距离表示差异程度

图2 各组大鼠肠道菌群种水平主坐标分析结果

表2 各组大鼠肠道菌群属水平主要物种相对丰度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	拟杆菌属	乳杆菌属	普雷沃氏菌属
空白组	3	0.1261 $\pm$ 0.0301	0.0074 $\pm$ 0.0012	0.1186 $\pm$ 0.0294
模型组	3	0.1992 $\pm$ 0.1517	0.0705 $\pm$ 0.0467	0.0177 $\pm$ 0.0214*
化癥通阳组	3	0.0813 $\pm$ 0.0101	0.2018 $\pm$ 0.4626	0.0645 $\pm$ 0.0081 Δ

注：与空白组比较，* $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta P < 0.05$

表3 各组大鼠肠道菌群种水平主要物种相对丰度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	鼠乳杆菌	拟杆菌	毛螺杆菌	普雷沃氏菌
空白组	3	0.0021 $\pm$ 0.0014	0.0561 $\pm$ 0.0122	0.0243 $\pm$ 0.0157	0.0248 $\pm$ 0.0071
模型组	3	0.0127 $\pm$ 0.0084	0.0277 $\pm$ 0.0426	0.0073 $\pm$ 0.0102	0.0030 $\pm$ 0.0049*
化癥通阳组	3	0.0712 $\pm$ 0.0160 Δ	0.0355 $\pm$ 0.0149	0.0036 $\pm$ 0.0047	0.0075 $\pm$ 0.0032

注：与空白组比较，* $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta P < 0.05$

差异菌为 *Mediterranea* 和帕拉普氏菌属；模型组差异菌为梭菌属、*Turicibacter*、*Faecalibaculum*；化癥通阳组差异菌为乳杆菌属和 *Akkermansia*。详见表4。

2.5 各组肠道菌群氨基酸代谢功能比较

表5示，苯丙氨酸降解各组间比较，差异有统计学意义 ($P = 0.027$)；模型组与空白组苯丙氨酸降解比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；化癥通阳组较模型组苯丙氨酸降解减少 ($P = 0.022$)。赖氨酸生物合成各组间比较差异有统计学意义 ($P =$

表4 各组大鼠属水平差异物种 (LDA 值 > 4)

组别	鼠数	属水平菌群	LDA 值
空白组	3	帕拉普氏菌属	4.339029
		<i>Mediterranea</i>	4.044447
模型组	3	梭菌属	5.33494
		<i>Turicibacter</i>	5.078743
		<i>Faecalibaculum</i>	4.657026
化癥通阳组	3	乳杆菌属	6.064559
		<i>Akkermansia</i>	5.515386

注：LDA，线性判别分析

0.010); 模型组与空白组赖氨酸生物合成比较, 差异无统计学意义 ($P=0.968$); 化瘀通阳组较模型组赖氨酸生物合成增加 ($P=0.006$)。

表 5 各组大鼠肠道菌群氨基酸代谢功能
相对丰度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	苯丙氨酸降解	赖氨酸生物合成
空白组	3	0.00094 $\pm$ 0.00003	0.00317 $\pm$ 0.00011
模型组	3	0.00139 $\pm$ 0.00058	0.00316 $\pm$ 0.00026
化瘀通阳组	3	0.00075 $\pm$ 0.00002 [△]	0.00374 $\pm$ 0.00008 [△]

注: 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

UC 是炎症性肠病 (IBD) 的一种类型, 属于中医学“久痢”范畴。我们认为, UC 是由于卫阳郁滞、瘀阻肠络所致。卫阳根于肾, 化于脾, 上输于肺, 布散于周身及脏腑之表, 具有抵御外邪、维持脏腑功能的作用。若邪犯大肠, 郁遏卫阳, 而致气机郁滞, 肠络受损, 大肠传导失职发为 UC, 故创立了具有宣通卫阳、活血化瘀的化瘀通阳方。方中蒲黄尤善止血, 兼有活血化瘀的功效, 有止血不留瘀的特点, 《神农本草经》言其“主心腹膀胱寒热、利小便, 止血, 消瘀血, 久服轻身益气力。”五灵脂活血止痛、化瘀止血。薤白辛散苦降, 温通滑利, 善散阴寒之凝滞。

UC 通常表现为肠黏膜持续且反复发作的炎症反应。肠道屏障在塑造和保护肠道中发挥重要作用, 是治疗 UC 的关键。研究^[20-21]表明, 调节肠道通透性和炎症免疫反应有利于保护肠道屏障功能并缓解 UC。课题组前期研究^[22-23]证明, 化瘀通阳方可通过改善肠黏膜通透性进而治疗 UC。近年来研究^[24]发现, IBD 患者肠道内菌群谱发生变化, 多样性降低, 细菌不稳定性增加。本研究从肠道微生物角度探讨化瘀通阳方对 UC 大鼠肠道屏障的作用, 通过分析属、种水平的菌群分布, 说明 UC 大鼠肠道菌群与经化瘀通阳方治疗后的 UC 大鼠肠道菌群构成存在差异。结肠 TDI 结果表明, 化瘀通阳方能减轻结肠黏膜炎症, 促进溃疡愈合。

研究^[25]表明, 相同来源健康动物的肠道菌群相似度高。本实验发现, UC 大鼠个体间肠道菌群差异较大, 而在正常大鼠及经治疗后的 UC 大鼠中这种差异较小, 说明化瘀通阳方可以调节 UC 大鼠肠道菌群趋于正常。分析各组间存在属水平和种水平的菌群构成, 发现尽管三组大鼠相对丰度排名前十的菌群种类相同, 但相对丰度却发生变化, 模型

组普雷沃氏菌属及普雷沃氏菌均明显减少, 化瘀通阳组普雷沃氏菌属、鼠乳杆菌均明显增加, 说明是化瘀通阳方通过调节菌群的丰度变化进而影响肠道菌群。

进一步分析差异菌群发现, 梭菌属、Turicibacter、Faecalibaculum 是模型组的优势菌群, 乳杆菌属和 Akkermansia 是化瘀通阳组的优势菌群。有研究^[26]表明, 梭菌属、Turicibacter、Faecalibaculum 的增加可能会增强 DSS 诱导的炎症反应。乳杆菌属作为益生菌在酸和胆汁中稳定^[27], 黏附在肠上皮细胞上, 防止病原体与肠黏液连接^[28], 同时可以增加黏蛋白的表达, 抑制致病性大肠杆菌, 对大肠杆菌诱导的肠黏膜损伤具有保护作用^[29]。乳杆菌属也可以通过与免疫细胞直接相互作用, 在维持胃肠道免疫平衡方面发挥重要作用^[30]。乳杆菌和 Akkermansia 均有代谢产生短链脂肪酸—丙酸的能力, 胃肠道中高剂量的乳酸菌可以产生更多的丙酸^[31], Akkermansia 的代谢产物是丙酸酯^[32]。丙酸有益于结肠上皮屏障功能^[33]。所以, 化瘀通阳方缓解 UC 或通过富集乳杆菌属和 Akkermansia 发挥作用。

宏基因组测序技术不但可以注释肠道菌群的种类和数量, 还可以预测肠道菌群的功能。肠道菌群是宿主体内最大的微生物群。肠道菌群的代谢潜能解释了其在宿主健康和疾病中的意义^[34]。本研究结果显示, 经化瘀通阳方干预后 UC 大鼠肠道菌群赖氨酸的合成增加, 苯丙氨酸降解减少。赖氨酸是人体必需的营养素, 但机体不能自行合成, 其获得依赖于食物, 除此之外, 肠道菌群也可以合成。目前关于肠道菌群合成的氨基酸对宿主产生的影响尚缺乏确切研究。微生物组学研究发现, 肠道菌群通过减少蛋白质的合成使 IBD 存在营养缺陷^[35], 在低质量蛋白质饮食中, 肠道菌群产生的氨基酸可能有助于弥补必需氨基酸的缺乏^[36], 但肠道菌群合成赖氨酸是否能促进 UC 的缓解仍需要更深入的验证。肠道菌群不但能够合成氨基酸, 同时还可以降解氨基酸而产生代谢衍生物^[37]。研究^[37]表明, 肠道菌群可以利用苯丙氨酸合成苯乙胺等。苯乙胺是神经递质, 研究发现苯乙胺与炎症性肠病的另一种类型克罗恩病呈正相关^[38], 但尚未发现与 UC 的确切关系。所以, 研究尚不足以说明氨基酸代谢变化与 UC 缓解之间是否存在关联。

综上, 化瘀通阳方可以促进 UC 肠黏膜愈合, 可以调节 UC 肠道菌群的丰度变化, 其诱导 UC 缓

解的机制可能与乳杆菌属和 *Akkermansia* 的富集有关, 同时化癍通阳方还可以增加肠道菌群赖氨酸生物合成, 减少苯丙氨酸的代谢。本实验尚处于初步研究阶段, 受实验客观条件制约, 样本量较小, 今后需扩大样本量进一步研究。

参考文献

- [1] 曹志群. 溃疡性结肠炎与肠道微生态 [J] // 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会. 第三十届全国中西医结合消化系统疾病学术会议论文集. 北京: 中国中西医结合学会, 2018: 1.
- [2] CAMPIERI M, GIONCHETTI P. Bacteria as the cause of ulcerative colitis [J]. *Gut*, 2001, 48(1): 132 – 135.
- [3] BIENENSTOCK J, KUNZE W, FORSYTHE P. Microbiota and the gut-brain axis [J]. *Nutr Rev*, 2015, 73: 28 – 31. doi: 10.1093/nutrit/nuv019.
- [4] ROUND JL, O'CONNELL RM, MAZMANIAN SK. Coordination of tolerogenic immune responses by the commensal microbiota [J]. *J Autoimmun*, 2010, 34(3): J220 – J225.
- [5] JANTCHOU P, MOROIS S, CLAVEL-CHAPELON F, et al. Animal protein intake and risk of inflammatory bowel disease: The E3N prospective study [J]. *Am J Gastroenterol*, 2010, 105(10): 2195 – 2201.
- [6] LAN A, BLACHIER F, BENAMOUZIG R, et al. Mucosal healing in inflammatory bowel diseases: is there a place for nutritional supplementation? [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2015, 21(1): 198 – 207.
- [7] SARTOR RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis [J]. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 2006, 3(7): 390 – 407.
- [8] PORTUNE KJ, BEAUMONT M, DAVILA AM, et al. Gut microbiota role in dietary protein metabolism and health-related outcomes: The two sides of the coin [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2016, 57: 213 – 232. doi: 10.1016/j.tifs.2016.08.011.
- [9] 施丽婕, 杨强, 垢敬, 等. 化癍通阳灌肠方对 UC 患者高凝状态的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27(8): 2155 – 2157.
- [10] 陈杨. 化癍通阳方联合美沙拉秦治疗轻中度 UC 的临床观察及实验研究 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2019.
- [11] 石磊, 施丽婕. 化癍通阳方治疗轻中度 UC 经验 [J]. *环球中医药*, 2016, 9(9): 1101 – 1102.
- [12] SHI L, WANG J, YANG Q, et al. Effect of Yang-activating and stasis-eliminating decoction from traditional Chinese medicine on intestinal mucosal permeability in rats with ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium [J]. *J Tradit Chin Med*, 2017, 37(4): 452 – 460.
- [13] 石磊. 化癍通阳方对 UC 治疗及 UC 大鼠 Occludin 蛋白表达影响的研究 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2015.
- [14] 施丽婕, 白洁琼, 刘旭, 等. 化癍通阳方药对 UC 大鼠 L/M 值及 P 选择素影响的观察 [J]. *天津中医药*, 2017, 34(5): 331 – 335.
- [15] 陈杨, 施丽婕, 刘雷蕾, 等. 基于 16S rDNA 测序研究化癍通阳方对 UC 大鼠肠道菌群的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(2): 941 – 946.
- [16] BAGCI C, BEIER S, GÓRSKA A, et al. Introduction to the analysis of environmental sequences: Metagenomics with MEGAN [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1910: 591 – 604. doi: 10.1007/978-1-4939-9074-0_19.
- [17] 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.
- [18] 鲁香凤, 张书信, 傅丽元, 等. 人溃疡性结肠炎与小鼠模型的组织病理学变化比较及机制探讨 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(5): 597 – 602.
- [19] 孔鹏飞, 赵兵, 覃勤, 等. 葡聚糖硫酸钠致溃疡性结肠炎急性期大鼠模型的建立与评价 [J]. *中华消化病与影像杂志(电子版)*, 2016, 6(1): 25 – 27.
- [20] VAN SPAENDONK H, CEULEERS H, WITTERS L, et al. Regulation of intestinal permeability: The role of proteases [J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(12): 2106 – 2123.
- [21] ZHENG JD, HE Y, YU HY, et al. Unconjugated bilirubin alleviates experimental ulcerative colitis by regulating intestinal barrier function and immune inflammation [J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(15): 1865 – 1878.
- [22] 白洁琼, 施丽婕. 化癍通阳方药、美沙拉秦灌肠对 UC 肠粘膜通透性影响的对照研究 [J] // 中华医学会消化病学分会. 中华医学会中华医学会第十六次全国消化病学学术会议论文集. 苏州: 中华医学会消化病学分会, 2016: 1205 – 1207.
- [23] 刘蕾蕾. 化癍通阳中药与单纯活血化癍中药对 UC 肠粘膜通透性影响的对照研究 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2015.
- [24] FRANZOSA EA, SIROTA-MADI A, AVILA-PACHECO J, et al. Gut microbiome structure and metabolic activity in inflammatory bowel disease [J]. *Nat Microbiol*, 2019, 4(2): 293 – 305.
- [25] 黄树武, 闵凡贵, 王静, 等. 常见 SPF 级小鼠和大鼠肠道菌群多样性研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(2): 229 – 235.
- [26] MUNYAKA PM, RABBI MF, KHAFIPOUR E, et al. Acute dextran sulfate sodium (DSS) -induced colitis promotes gut microbial dysbiosis in mice [J]. *J Basic Microbiol*, 2016, 56(9): 986 – 998.
- [27] CHOU LS, WEIMER B. Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus* [J]. *J Dairy Sci*, 1999, 82(1): 23 – 31.
- [28] FORESTIER C, DE CC, VATOUX C, et al. Probiotic

- activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties [J]. *Res Microbiol*, 2001, 152(2): 167–173.
- [9] KARIMI S, JONSSON H, LUNDH T, et al. *Lactobacillus reuteri* strains protect epithelial barrier integrity of IPEC-J2 monolayers from the detrimental effect of enterotoxigenic *Escherichia coli* [J]. *Physiol Rep*, 2018, 6(2): e13514.
- [10] WILKINS T, SEQUOIA J. Probiotics for gastrointestinal conditions: a summary of the evidence [J]. *Am Fam Physician*, 2017, 96(3): 170–178.
- [11] FORSSTEN S, OUWEHAND AC. Dose-response recovery of probiotic strains in simulated gastro-intestinal passage [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(1): 112.
- [12] LUKOVAC S, BELZER C, PELLIS L, et al. Differential modulation by *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* of host peripheral lipid metabolism and histone acetylation in mouse gut organoids [J]. *MBio*, 2014, 5(4): e01438–14. doi: 10.1128/mBio.01438-14.
- [13] VIEIRA EL, LEONEL AJ, SAD AP, et al. Oral administration of sodium butyrate attenuates inflammation and mucosal lesion in experimental acute ulcerative colitis [J]. *J Nutr Biochem*, 2012, 23(5): 430–436.
- [14] YADAV M, VERMA MK, CHAUHAN NS. A review of metabolic potential of human gut microbiome in human nutrition [J]. *Arch Microbiol*, 2018, 200(2): 203–217.
- [15] MORGAN XC, TICKLE TL, SOKOL H, et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment [J]. *Genome Biol*, 2012, 13(9): 307–317.
- [16] KOSTIC AD, XAVIER RJ, GEVERS D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead [J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(6): 1489–1499.
- [17] OLIPHANT K, ALLEN-VERCOE E. Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: major fermentation by-products and their impact on host health [J]. *Microbiome*, 2019, 7(1): 91.
- [18] SANTORU ML, PIRAS C, MURGIA A, et al. Cross sectional evaluation of the gut-microbiome metabolome axis in an Italian cohort of IBD patients [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 9523.

Effects of *Huayu Tongyang Formula* (化瘀通阳方) on the Intestinal Flora and Amino Acid Metabolism of Rats with Ulcerative Colitis

SHI Lijie¹, LIU Suyi¹, YU Xiao¹, CHEN Yang², YANG Jie¹, WANG Jing¹, LIU Leilei³, HE Sufei⁴

1. First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin, 300380; 2. Pinghu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang Province; 3. Beijing University of Chinese Medicine; 4. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Huayu Tongyang Formula* (化瘀通阳方) in the treatment of ulcerative colitis (UC). **Methods** A total of 24 Wistar rats were randomly divided into a blank group of 8 rats and a model replication group of 16 rats. In the model replication group, 5% dextran sodium sulfate (DSS) solution was used to induce UC rat model. The 10 successfully modeling rats were randomly divided into a *Huayu Tongyang* group and a model group, with 5 rats in each group. The *Huayu Tongyang* group was given a retention enema with concentration of 0.54 g/ml *Huayu Tongyang Formula* at a dose of 2 ml, and rats in the blank group and model group received the same amount of normal saline enema for 10 consecutive days. After the intervention, the colonic histopathology was observed, and rat feces were collected for metagenomic sequencing analysis of intestinal flora.

Results The colonic mucosa congestion and edema, structural disorder, and inflammatory cell infiltration in the submucosa were found in the model group; the structure of the colonic mucosa of rats in the *Huayu Tongyang* group returned to normal, with individual inflammatory cell infiltration and active gland hyperplasia. Compared with the blank group, the colon tissue injury index (TDI) score of the model group increased, and the genus and species levels of *Prevotella* decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the rat colonic TDI score in the *Huayu Tongyang* group decreased, the genus level of *Prevotella* and the species level of *Lactobacillus murine* increased, the degradation of phenylalanine decreased, and the biosynthesis of lysine increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Lefse analysis showed that the differential bacteria in the model group were *Clostridium*, *Turicibacter*, and *Faecalibaculum*, and the differential bacteria in the *Huayu Tongyang* group were mainly *Lactobacillus* and *Akkermansia*. **Conclusion** *Huayu Tongyang Formula* can promote the mucosa healing of UC and regulate the abundance change of intestinal flora, and its mechanism may be related to the enrichment of *Lactobacillus* and *Akkermansia*.

Keywords ulcerative colitis; *Huayu Tongyang Formula* (化瘀通阳方); intestinal flora; amino acid metabolism; macro gene

(收稿日期: 2019-11-05; 修回日期: 2020-06-20)

编辑: 王利芬