

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.01.011

活血解毒方对 NOD 小鼠肠道菌群的影响

王海瑜¹, 张玉婷¹, 柏志义¹, 李媛¹, 王若伊¹,
王永锋¹, 刘小平², 朱跃兰², 侯秀娟²✉



1. 北京中医药大学, 北京市朝阳区北三环东路 11 号, 100029; 2. 北京中医药大学东方医院

[摘要] **目的** 探讨活血解毒方治疗干燥综合征的可能作用机制。**方法** 35 只干燥综合征经典动物模型 NOD 小鼠随机分为模型组、白芍总苷组及活血解毒方高、中、低剂量组, 每组 7 只, 另设 7 只 C57BL/6J 小鼠作为正常组。正常组与模型组小鼠均以 10 ml/kg 蒸馏水灌胃, 白芍总苷组以 234 mg/kg 白芍总苷胶囊灌胃, 活血解毒方高、中、低剂量组分别按 62.4、31.2、15.6 g/(kg·d) 灌胃活血解毒方。8 周后观察各组小鼠颌下腺病理染色结果并进行评分, 同时通过高通量测序检测各组小鼠肠道菌群的组成结构、优势菌群, 并进行多样性分析。**结果** 与正常组比较, 模型组、白芍总苷组颌下腺病理组织评分升高 ($P<0.01$)。HE 染色显示, 模型组可见外分泌腺结构破坏, 腺泡不同程度萎缩, 组织出现多灶性淋巴细胞浸润; 活血解毒方各剂量组上述病理损伤减轻, 少量散在淋巴细胞浸润, 但未聚集成灶, 其中活血解毒方中、高剂量组淋巴细胞浸润程度较活血解毒方低剂量组减轻。基于门水平分析, 与正常组比较, 模型组疣微菌门丰度降低、TM7 菌门丰度升高 ($P<0.05$); 与模型组及白芍总苷组比较, 活血解毒方低剂量组脱铁杆菌门丰度均升高 ($P<0.05$)。基于属水平分析, 与正常组比较, 模型组臭味杆菌属丰度升高、普氏菌属丰度降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与活血解毒方低剂量组比较, 活血解毒方高剂量组臭味杆菌属丰度降低 ($P<0.01$)。组间差异菌种筛选结果显示, 正常组优势菌种 19 种, 模型组优势菌种 6 种, 白芍总苷组优势菌群 1 种, 活血解毒方低、中、高剂量组优势菌种分别为 6 种、2 种、8 种。Alpha 多样性分析显示, 与正常组比较, 模型组 Faith_Pd 指数下降 ($P<0.05$); 与模型组比较, 活血解毒方低、中剂量组 Faith_Pd 指数均升高 ($P<0.01$)。Beta 多样性分析显示, 除活血解毒方低剂量与活血解毒方中剂量组、活血解毒方中剂量组与活血解毒方高剂量组之间无差异外, 其余各组之间肠道菌群结构差异均具有统计学意义 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 活血解毒方可调节 NOD 小鼠肠道菌群结构、促进有益菌的生长、加快菌群的恢复, 这可能是其治疗干燥综合征的机制之一。

[关键词] 干燥综合征; 肠道菌群; 活血解毒方; 颌下腺; NOD 小鼠

干燥综合征 (sjogron syndrome, SS) 是最常见的自身免疫性疾病之一, 临床以口干、眼干、乏力及肌肉、骨骼疼痛为主要表现, 并可同时合并腺体外损伤而出现其他系统病变^[1]。SS 发病机制目前尚不明确, 可能与遗传、免疫、环境等多种因素相关^[2-3]。有研究发现, SS 患者肠道菌群存在明显失调^[4-5], 而益生菌可以缓解 SS 模型小鼠的眼干症

状^[6], 提示 SS 发病与菌群失调存在一定的关联。SS 属于中医学“燥痹”范畴, 毒、瘀虚相互交织是其发病关键, 活血解毒、滋阴润燥为常用治疗法则之一^[7]。前期研究^[8]结果显示, 以活血解毒润燥为法的活血解毒方可改善 SS 患者口干、眼干、便秘症状, 降低血沉、免疫球蛋白、涎腺病变超声评分等相关指标。本研究观察活血解毒方对 SS 的经典动物模型 NOD 小鼠肠道菌群的影响, 以探讨活血解毒方治疗 SS 的可能作用机制。本研究通过北京中医药大学东方医院实验动物伦理委员会批准 (批准号: 202001)。

基金项目: 北京中医药大学东方医院 1166 人才培养计划 (040204001001002006); 国家自然科学基金 (81774275); 北京市丰台区临床重点专科项目

✉ 通讯作者: houxijuan2008@163.com, 13520161572

1 材料

1.1 动物

SPF 级 C57BL/6J 雌性小鼠 7 只, 8 周龄, 体重 18~22 g, 斯贝福生物科技有限公司, 生产许可证号: SCXK(京) 2019-0010; NOD 雌性小鼠 35 只, 8 周龄, 体重 18~22 g, 江苏集萃药康生物科技股份有限公司, 生产许可证号: SCXK(苏) 2018-0008。实验动物饲养于北京中医药大学东方医院屏障级动物房中, 恒温恒湿, 自由进食及饮水。

1.2 药物

活血解毒方组成: 丹参 30 g, 玄参 20 g, 连翘 15 g, 川芎 15 g, 鸡血藤 20 g, 炒白芍 30 g, 生地 30 g, 麦冬 20 g, 石斛 20 g, 南沙参 15 g, 北沙参 15 g, 甘草 10 g。以上药物采用颗粒剂(北京同仁堂药业有限公司生产), 由北京中医药大学东方医院颗粒药房提供。将中药颗粒用蒸馏水溶解, 分别制备成浓度为含生药 2、4、8 g/ml 溶液。白芍总苷胶囊购自宁波立华制药有限公司, 规格 0.3 g/粒, 批号: 160803, 将胶囊溶于蒸馏水中, 调至浓度为 0.03 g/ml。

1.3 主要试剂和仪器

2% 琼脂糖凝胶(西班牙 Biowest 公司, 货号: 111860), DNA 抽提试剂盒(美国 Omega Bio-Tek 公司, 货号: M5636-02), FastPfu 聚合酶(中国全式金生物技术有限公司, 货号: AS221-02), Axy-Prep DNA Gel Extraction 试剂盒(美国 Axygen 公司, 货号: AP-GX-250G), 苏木素-伊红染液试剂盒(江苏凯基生物技术有限公司, 货号: KGA224)。

PCR 仪(美国 ABI 公司, 型号: Gene-Amp®9700 型), Illumina MiSeq 平台(美国 Illumina 公司, 型号: TruSeq™ DNA Sample Prep Kit), 测序仪(美国 Illumina 公司, 型号: Illumina Miseq), 荧光针(美国 Promega 公司, 型号: QUANTIFLUOR™ ST/P), 光学显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司, 型号: AE41), 超微量分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 型号: NanoDrop2000), 电泳仪(Thermo 公司, 型号: Ec250-90)。

2 方法

2.1 动物分组及给药

将 35 只 NOD 小鼠采用随机数字表法分为模型组、白芍总苷组及活血解毒方高、中、低剂量组, 每组 7 只。7 只 C57BL/6J 小鼠作为正常组。适应性

喂养 1 周后, 活血解毒方高、中、低剂量组分别按 62.4、31.2、15.6 g/(kg·d) 灌胃。小鼠给药剂量按人和动物体表面积折算^[9], 其中中剂量组是临床等效剂量。白芍总苷组灌胃 234 mg/kg 白芍总苷胶囊, 正常组、模型组灌胃 10 ml/kg 蒸馏水。各组均每日 1 次, 共干预 8 周。

2.2 颌下腺病理组织评分

最后 1 次灌胃后禁食 12 h, 处死小鼠, 每组根据随机数字表法各选取 5 只小鼠取颌下腺组织, 用 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋、切片、HE 染色。参照文献^[10]方法光镜下对颌下腺形态进行评分, 0 分: 偶见淋巴细胞浸润; 1 分: 少量散在淋巴细胞浸润; 2 分: 淋巴细胞中度浸润, 未成灶, 伴有轻度实质损伤; 3 分: 见 0 或 1 个淋巴细胞浸润灶/5 个低倍视野, 伴中度实质损伤; 4 分: 见 2 或 3 个淋巴细胞浸润灶/5 个低倍视野, 伴有重度实质损伤。

2.3 肠道菌群检测

各组小鼠处死后立即剖腹取所有的结肠与直肠内容物, 放置于冻存管中, 放入液氮速冻, -80 ℃ 超低温冰箱保存, 用于检测肠道菌群。

2.3.1 DNA 抽提和 PCR 扩增 根据 DNA 抽提试剂盒说明书进行总 DNA 抽提, 用超微量分光光度计检测 DNA 浓度与纯度, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量, 用 338F (5'-ACTCCTACGGGAG GCAGCAG-3') and 806R (5'-GGACTACHVGGGT-WTCTAAT-3') 引物对 V3-V4 可变区进行 PCR 扩增。

2.3.2 Illumina Miseq 测序 使用 2% 琼脂糖凝胶回收 PCR 产物, 利用 AxyPrep DNA Gel Extraction 试剂盒进行纯化, Tris-HCl 洗脱, 2% 琼脂糖电泳检测, 利用荧光针进行定量。根据 Illumina MiSeq 平台标准操作规程将纯化后的扩增片段构建 PE 2×300 的文库。利用 Illumina MiSeq 测序平台进行测序。

2.3.3 生物信息学分析 对测序得到的原始序列进行过滤处理, 得到有效数据。基于有效数据进行操作分类单元(OTUs)聚类, 形成 OTUs 物种丰度谱。Shannon 稀释性曲线分析物种饱和度, 采用线性判别分析(LDA)法鉴定组间丰度有差异的细菌, 用 Chao1 指数、Faith_Pd 指数分析物种 Alpha 多样性, 用多元方差分析组间 Beta 多样性。

2.4 统计学方法

用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。计量资料符合正态分布用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较用方差分

析, 两两比较方差齐时用 LSD 检验, 方差不齐时用 Dunnett's T^0 检验; 非正态分布计量资料以中位数 (M) 和四分位数 (P_{25}, P_{75}) 表示, 采用非参数秩和检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠颌下腺病理组织评分比较

表 1 示, 与正常组比较, 模型组、白芍总苷组小鼠颌下腺病理组织评分升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 白芍总苷组、活血解毒方各剂量组颌下腺病理组织评分差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组小鼠颌下腺病理组织评分比较[分, $M(P_{25}, P_{75})$]

组别	鼠数	颌下腺病理组织评分
正常组	5	0
模型组	5	4.00 (3.50, 4.00) ^{a)}
白芍总苷组	5	3.00 (3.00, 3.50) ^{a)}
活血解毒方低剂量组	5	3.00 (2.00, 3.00)
活血解毒方中剂量组	5	2.00 (1.50, 3.00)
活血解毒方高剂量组	5	2.00 (2.00, 3.00)

注: a) 与正常组比较, $P < 0.01$ 。

3.2 各组小鼠颌下腺病理组织染色结果

图 1 示 (扫描本文二维码获取彩图), 正常组小鼠颌下腺组织结构未见异常。模型组可见外分泌腺结构破坏, 腺泡不同程度萎缩, 组织出现多灶性淋巴细胞浸润。白芍总苷组腺泡亦有一定程度的萎缩破坏, 偶见淋巴细胞浸润灶。活血解毒方各剂量组上述病理损伤减轻, 少量散在淋巴细胞浸润, 但未聚集成灶, 其中活血解毒方中、高剂量组淋巴细胞浸润程度较活血解毒方低剂量组减轻。

3.3 各组小鼠肠道菌群组成结构比较

测序数据经过标识码拆分后获得 2 775 404 条

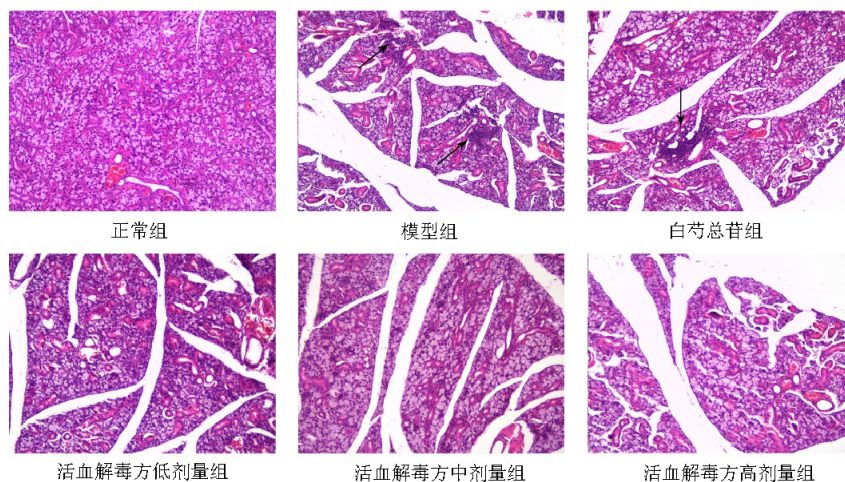
有效序列, 有效序列范围为 51 510 ~ 74 948 条, 平均为 66 081 条。Shannon 稀释性曲线图已趋于平缓, 表明本次测序已足够反映当前样本所包含的多样性; 6 组共有 304 个相同的 OTUs, 正常组、模型组、白芍总苷组及活血解毒方高、中、低剂量组分别有 175、68、56、64、81、84 个特征的 OTUs。

表 2 示, 门水平中各组优势菌门均为拟杆菌门、厚壁菌门、变形菌门、放线菌门、脱铁杆菌门、疣微菌门、TM7 菌门。与正常组比较, 模型组疣微菌门丰度降低、TM7 菌门丰度升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 活血解毒方低剂量组脱铁杆菌门丰度升高 ($P < 0.05$); 与白芍总苷组比较, 活血解毒方低剂量组脱铁杆菌门丰度升高 ($P < 0.05$), 活血解毒方高、中剂量组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 示, 属水平优势菌落结构依次为 S24_7、毛螺菌属、梭菌属、颤螺旋菌属、臭味杆菌属、拟杆菌属、普氏菌属等。与正常组比较, 模型组臭味杆菌属丰度升高、普氏菌属丰度降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与活血解毒方低剂量组比较, 活血解毒方高剂量组臭味杆菌属丰度降低 ($P < 0.01$)。

3.4 各组小鼠肠道菌群优势菌种筛选结果

LDA > 2 表明该菌种在本组中为优势菌种。正常组优势菌种为阿克曼氏菌属 (LDA 为 4.74, 下同)、疣微菌科 (4.74)、疣微菌门 (4.74)、疣微菌目 (4.74)、疣微菌纲 (4.74)、变形菌门 (4.71)、双歧杆菌目 (4.16)、双歧杆菌属 (4.16)、双歧杆菌科 (4.16)、放线菌门 (4.16)、别样杆菌属 (4.11)、粪芽孢菌属 (3.91)、萨特氏菌属 (3.91)、产碱菌科 (3.91)、苏黎世杆菌目



注: 图中黑色箭头所示为淋巴细胞浸润灶。

图 1 各组小鼠颌下腺病理组织染色图 (HE 染色, $\times 100$)

表2 各组小鼠肠道菌群检测门水平排名前7位的微生物群落丰度比较 (%, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	拟杆菌门	厚壁菌门	变形菌门	放线菌门
正常组	7	0.48±0.20	0.36±0.16	0.07±0.03	0.05±0.04
模型组	7	0.59±0.16	0.35±0.14	0.05±0.06	0
白芍总苷组	7	0.58±0.07	0.37±0.07	0.04±0.03	0
活血解毒方低剂量组	7	0.58±0.15	0.33±0.14	0.06±0.03	0
活血解毒方中剂量组	7	0.54±0.14	0.39±0.12	0.05±0.03	0.01±0.00
活血解毒方高剂量组	7	0.61±0.17	0.33±0.16	0.04±0.02	0

组别	鼠数	脱铁杆菌门	疣微菌门	TM7 菌门
正常组	7	0	0.04±0.08	0
模型组	7	0	0 ^{a)}	0.01±0.01 ^{a)}
白芍总苷组	7	0	0	0.01±0.01
活血解毒方低剂量组	7	0.02±0.02 ^{b) c)}	0.01±0.03	0
活血解毒方中剂量组	7	0.01±0.01	0	0.01±0.00
活血解毒方高剂量组	7	0.01±0.02	0	0.01±0.01

注: a) 与正常组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与白芍总苷组比较, $P<0.05$ 。

表3 各组小鼠肠道菌群检测属水平排名前7位的微生物群落丰度比较 (%, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	S24_7	毛螺菌属	梭菌属	颤螺旋菌属
正常组	7	0.30±0.07	0.17±0.17	0.05±0.03	0.03±0.01
模型组	7	0.36±0.15	0.10±0.07	0.09±0.05	0.05±0.04
白芍总苷组	7	0.35±0.06	0.10±0.02	0.09±0.02	0.06±0.03
活血解毒方低剂量组	7	0.29±0.13	0.11±0.06	0.08±0.05	0.06±0.03
活血解毒方中剂量组	7	0.31±0.09	0.14±0.08	0.10±0.04	0.07±0.02
活血解毒方高剂量组	7	0.32±0.12	0.12±0.08	0.08±0.03	0.05±0.03

组别	鼠数	臭味杆菌属	拟杆菌属	普氏菌属
正常组	7	0.01±0.01	0.02±0.01	0.11±0.12
模型组	7	0.06±0.03 ^{b)}	0.06±0.04	0.01±0.01 ^{a)}
白芍总苷组	7	0.06±0.03	0.07±0.04	0.01±0.04
活血解毒方低剂量组	7	0.07±0.02	0.03±0.02	0.05±0.06
活血解毒方中剂量组	7	0.05±0.03	0.04±0.03	0.04±0.07
活血解毒方高剂量组	7	0.04±0.01 ^{c)}	0.07±0.06	0.05±0.07

注: a) 与正常组比较, $P<0.05$; b) 与正常组比较, $P<0.01$; c) 与活血解毒方低剂量组比较, $P<0.01$ 。

(3.91)、伯克氏菌目 (3.89)、β-变形菌属 (3.89)、苏黎世杆菌科 (3.87)、苏黎世杆菌属 (3.85); 模型组优势菌种为理研菌属 (3.85)、乳球菌属 (3.79)、孪生球菌属 (3.73)、孪生菌科 (3.73)、孪生菌目 (3.73)、链球菌属 (3.69); 白芍总苷组优势菌种为梭菌属 (4.26); 活血解毒方低剂量组优势菌种为臭味杆菌 (4.99)、臭味菌科 (4.99)、脱铁杆菌科 (4.36)、脱铁杆菌门 (4.36)、脱铁杆菌目 (4.36)、牧斯皮氏菌属 (4.36); 活血解毒方中剂量组优势菌种为瘤胃球菌属 (4.05)、颤螺菌属 (4.82); 活血解毒方高剂量组优势菌种为拟杆菌属 (4.87)、拟杆菌科 (4.87)、紫单胞菌科 (4.21)、副杆菌属 (4.21)、巴恩斯氏菌属 (3.89)、巴恩斯氏菌科 (3.87)、AF12菌属 (3.74)、粪杆菌属 (3.59)。

3.5 各组小鼠肠道菌群多样性分析结果

3.5.1 各组小鼠肠道菌群 Alpha 多样性分析结果

表4示, 各组 Chao1 指数比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。与正常组比较, 模型组 Faith_Pd 指数下降 ($P<0.05$); 与模型组比较, 活血解毒方中、低剂量组 Faith_Pd 指数上升 ($P<0.01$), 白芍总苷组及活血解毒方高剂量组差异均无统计学意义 ($P>0.05$); 活血解毒方中、低剂量组 Faith_Pd 指数高于白芍总苷组及活血解毒方高剂量组 ($P<0.01$)。

3.5.2 各组小鼠肠道菌群 Beta 多样性分析结果

表5示, 除活血解毒方低剂量组与活血解毒方中剂量组、活血解毒方中剂量组与活血解毒方高剂量组肠道菌群结构无差异外, 其余各组之间肠道菌群结构差异均具有统计学意义 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表 4 各组小鼠肠道菌群丰富度 Chao1 指数、Faith_Pd 指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Chao1 指数	Faith_Pd 指数
正常组	7	318.5±44.06	19.8±1.98
模型组	7	292.6±48.27	17.9±1.67 ^{a)}
白芍总苷组	7	325.3±15.24	18.5±0.84
活血解毒方低剂量组	7	337.4±29.55	20.3±0.93 ^{b) c)}
活血解毒方中剂量组	7	332.7±26.02	20.2±0.70 ^{b) c)}
活血解毒方高剂量组	7	307.5±35.00	18.6±0.64 ^{d) e)}

注：a) 与正常组比较， $P < 0.05$ ；b) 与模型组比较， $P < 0.01$ ；c) 与白芍总苷组比较， $P < 0.01$ ；d) 与活血解毒方低剂量组比较， $P < 0.01$ ；e) 与活血解毒方中剂量组比较， $P < 0.01$ 。

4 讨论

研究^[11]显示，肠道菌群刺激肠上皮细胞分泌多种免疫介质，包括细胞因子和趋化因子，调节宿主免疫反应，以维持肠道菌群和宿主免疫系统之间良好的平衡关系。肠道菌群的改变可引起多种自身免疫性疾病的发生发展，其中 SS 的发病与菌群改变密切相关^[4,12-13]。NOD 小鼠是研究 SS 的经典模型鼠，其发病机制与人类高度相似^[14]。本研究结果显示，SS 模型小鼠颌下腺腺体结构出现萎缩破坏，多灶性淋巴细胞浸润，小鼠肠道菌群较正常组出现链球菌属丰度的显著增加，这与其他研究结果^[15-16]一致。

活血解毒方中丹参^[17]、玄参^[18]、连翘^[19]、白芍^[20]等多味中药均对肠道菌群具有调节作用。白芍总苷是从中药白芍里提取的一种糖苷类物质，是白芍的主要化学成分，可有效改善 SS 患者口干、

眼干等临床症状，具有较好的临床疗效，且安全性较好^[21]，因此选取其作为对照药物。本研究结果显示，活血解毒方可一定程度改善小鼠颌下腺组织的慢性炎症损伤，减轻淋巴细胞浸润，但病理评分与模型组比较差异无统计学意义，可能与中药发挥疗效有一定的时间依赖性有关，后续延长给药时间可能会观察到模型组与各给药组之间的差异。

Alpha 多样性主要用来对某个样品中物种组成的丰度与多样性进行分析，用 Chao1 指数来表示菌群的丰度，数值越高，代表样本中菌群丰度越高；用 Faith_Pd 指数来表示菌群的多样性，指数越高，表明样本多样性越复杂。本研究中与正常组比较，模型组菌群的 Faith_Pd 指数下降，而活血解毒方中、低剂量组较模型组、白芍总苷组及活血解毒方高剂量组 Faith_Pd 指数均升高，表明活血解毒方可以提高 NOD 小鼠的菌群多样性及丰度，而活血解毒方高剂量组相比活血解毒方中、低剂量组菌群的多样性及丰度降低，提示活血解毒方对菌群多样性及丰度的影响与剂量无关。Beta 多样性分析结果表明，除活血解毒方低剂量组与活血解毒方中剂量组、活血解毒方中剂量组与活血解毒方高剂量组肠道菌群结构组间差异无统计学意义外，其余组间菌群结构差异均有统计学意义，提示各组均具有特征的菌群结构。

基于门水平分析各组小鼠排名前 7 的微生物群落结构发现，与正常组比较，模型组 TM7 菌门丰度升高、疣微菌门丰度下降；与模型组比较，活血

表 5 各组小鼠肠道菌群 Beta 多样性分析多元方差分析结果

组别	对比组别	样本量	pseudo-F 检验	P 值	q 值
正常组	模型组	7	5.686497	0.001	0.002143
	白芍总苷组	7	5.605560	0.001	0.002143
	活血解毒方低剂量组	7	3.520502	0.001	0.002143
	活血解毒方中剂量组	7	3.900152	0.002	0.002727
	活血解毒方高剂量组	7	3.974927	0.001	0.002143
模型组	白芍总苷组	7	2.450735	0.002	0.002727
	活血解毒方低剂量组	7	2.144984	0.001	0.002143
	活血解毒方中剂量组	7	3.248614	0.001	0.002143
	活血解毒方高剂量组	7	3.224453	0.001	0.002143
白芍总苷组	活血解毒方低剂量组	7	1.995861	0.002	0.002727
	活血解毒方中剂量组	7	2.869684	0.003	0.003750
	活血解毒方高剂量组	7	2.922334	0.002	0.002727
活血解毒方低剂量组	活血解毒方中剂量组	7	1.255427	0.123	0.131786
	活血解毒方高剂量组	7	1.680317	0.011	0.012692
活血解毒方中剂量组	活血解毒方高剂量组	7	1.190458	0.162	0.162000

注：q 值为校正过的 P 值， $q < 0.05$ 为组间菌群结构差异存在统计学意义。

解毒方低剂量组可升高脱铁杆菌门的丰度。基于属水平分析各组小鼠排名前 7 的微生物群落结构发现,与正常组比较,模型组臭味杆菌属丰度升高、普氏菌属丰度降低,提示相关菌种可能参与了 SS 的免疫病理过程,而活血解毒方可能通过提高有益菌如脱铁杆菌门的表达水平发挥干预 SS 的作用。基于属水平进一步寻找各组间的特征菌属,正常组优势菌种多样且丰度较高,其中有益菌及中性菌阿克曼氏菌属、疣微菌科、疣微菌门、疣微菌目、疣微菌纲、双歧杆菌目、双歧杆菌属、双歧杆菌科、放线菌门、产碱菌科、苏黎世杆菌目、伯克氏菌目、苏黎世杆菌属占主要优势;模型组优势菌属为理研菌属、乳球菌属、孪生球菌属、孪生菌科、孪生菌目、链球菌属。研究发现,狼疮小鼠从病前阶段到疾病阶段理研菌属丰度显著增加^[22],在对系统性红斑狼疮进行泼尼松治疗后,理研菌属丰度下降^[23]。系统性红斑狼疮与 SS 具有相似的发病特点^[24],两种疾病在肠道菌群的组成方面具有高度相似性^[25],故理研菌属丰度增加可能是 SS 发病机制之一。另有研究^[26-27]表明,理研菌属属于理研菌科,而理研菌科类细菌产生的短链脂肪酸可加强肠道黏膜的完整性,抑制肠道炎症反应,在维持肠道微生态平衡方面发挥着重要作用。因此,理研菌属在 SS 中究竟发挥何种作用还有待进一步研究。

乳球菌属、链球菌属和孪生球菌属都属于革兰阳性兼性厌氧球菌。乳球菌是一种罕见的机会致病菌,可引起腹泻、腹膜炎等感染性疾病^[28-29],动物实验发现乳球菌属可迅速激活先天免疫,引发炎症反应^[30]。临床研究发现,SS 患者链球菌属、孪生球菌属较正常组明显升高^[15],本研究结果与其一致。链球菌属的升高与外周调节性 T 细胞计数呈负相关,具有抑制炎症反应、维持免疫稳态作用的 Treg 细胞计数的下降参与了 SS 的发病^[31]。由此提示,链球菌属可能通过降低 Treg 细胞,从而诱发免疫异常,是 SS 发病的重要不利因素。本研究结果显示,与模型组比较,活血解毒方高剂量组干预后,小鼠肠道菌群多样性恢复加快,且有益菌拟杆菌、副杆菌属、巴恩斯氏菌、粪杆菌属成为优势菌种,表明活血解毒方可以调节 SS 模型小鼠的肠道菌群结构,加快有益菌的生长,促进菌群的恢复。

综上,活血解毒方可通过促进 SS 模型小鼠肠道有益菌的生长,改善菌群结构,达到治疗 SS 的目的,这可能是活血解毒方发挥治疗作用的重要生物学基础。但究竟是菌群失调引起了疾病变化,还

是疾病引起了菌群的紊乱,以及肠道菌群如何从局部触发全身免疫反应,以上问题仍有待进一步研究。

参考文献

- [1] MARSHALL LL, STEVENS GA. Management of primary Sjögren's syndrome [J]. Consult Pharm, 2018, 33 (12): 691-701.
- [2] 王瑞婷,陈雁飞,汪钰涵,等. T 细胞亚群在原发性干燥综合征发病机制中的研究进展[J]. 兰州大学学报(医学版), 2020, 46(6): 45-50.
- [3] VIVINO FB, BUNYA VY, MASSARO-GIORDANO G, et al. Sjögren's syndrome: An update on disease pathogenesis, clinical manifestations and treatment [J]. Clin Immunol, 2019, 203: 81-121. doi: 10.1016/j.clim.2019.04.009.
- [4] MOON J, CHOI SH, YOON CH, et al. Gut dysbiosis is prevailing in Sjögren's syndrome and is related to dry eye severity [J]. PLoS One, 2020, 15 (2): e0229029. doi: 10.1371/journal.pone.0229029
- [5] WU GL, LU HF, CHEN YL, et al. Changes of intestinal microecology in patients with primary Sjögren's syndrome after therapy of yangyin yiqi huoxue recipe [J]. Chin J Integr Med, 2019, 25(9): 654-662.
- [6] KIM J, CHOI SH, KIM YJ, et al. Clinical effect of IRT-5 probiotics on immune modulation of autoimmunity or alloimmunity in the eye [J]. Nutrients, 2017, 9(11): 1166.
- [7] 杜欣颖,白云静,申洪波. 胡荫奇从毒、瘀、虚论治原发性干燥综合征经验[J]. 中医杂志, 2020, 61(18): 1594-1597.
- [8] 徐江喜. 活血解毒方治疗原发性干燥综合征瘀毒证的疗效评价[D]. 北京:北京中医药大学, 2019.
- [9] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1982: 129-131.
- [10] CUTLER LS, GREINER DL, ROZENSKI D. Experimental autoallergic sialadenitis in the LEW rat. II. Target antigens are associated with cell surface and intracellular particulate fractions derived from the submandibular gland [J]. Cell Immunol, 1991, 135(2): 346-353.
- [11] OKUMURA R, TAKEDA K. Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis [J]. Exp Mol Med, 2017, 49 (5): e338. doi: 10.1038/emmm.2017.20
- [12] SINGH M, TELES F, UZEL NG, et al. Characterizing microbiota from Sjögren's syndrome patients [J]. JDR Clin Trans Res, 2021, 6(3): 324-332.
- [13] ANTONIO CO, AURORA LI, ISAAC PA, et al. Connection between the gut microbiome, systemic inflammation, gut permeability and FOXP3 expression in patients

- with primary Sjögren's syndrome [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(22): 8733.
- [14] 王其凯, 袁祥, 周滢波, 等. 共刺激分子 B7-H4 对干燥综合征模型 NOD 鼠 T 细胞亚群的作用[J]. *中华疾病控制杂志*, 2018, 22(7): 731-735.
- [15] 毛晓娟. 干燥综合征患者外周血中 Treg 和 Th17 细胞绝对数量与肠道微生物菌落特征的相关性研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2020.
- [16] 王信, 王健, 郭文静, 等. 原发性干燥综合征患者肠道菌群特点分析[J]. *南方医科大学学报*, 2020, 40(7): 949-957.
- [17] 蔡红蝶, 宿树兰, 郭建明, 等. 丹参对糖尿病肾损伤大鼠肠道菌群多样性的影响[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(2): 426-435.
- [18] 戚宇琪. 玄参-苍术对 2 型糖尿病大鼠的降糖增效作用及对肠道菌群结构的影响[D]. 太原: 山西省中医药研究院, 2020.
- [19] 周祎青, 郑裕华, 陈颂, 等. 连翘对岭南湿热模型小鼠的作用及其肠道菌群变化的研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(6): 678-685.
- [20] 彭金娥, 韩雅馨, 卢旭然, 等. 白芍总苷长期给药对胶原诱导型关节炎大鼠和正常大鼠肠道菌群影响的纵向研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2021, 32(1): 1-16.
- [21] 陆带果, 王璐瑶, 王贵红, 等. 白芍总苷胶囊联合硫酸羟氯喹治疗干燥综合征的临床效果[J]. *中国医药导报*, 2019, 16(36): 115-118.
- [22] LUO XM, EDWARDS MR, MU Q, et al. Gut microbiota in human systemic lupus erythematosus and a mouse model of lupus [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2018, 84(4): e02288-17. doi: 10.1128/AEM.02288-17.
- [23] HE Z, KONG X, SHAO T, et al. Alterations of the gut microbiota associated with promoting efficacy of prednisone by bromofuranone in MRL/lpr mice [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 978. doi: 10.3389/fmicb.2019.00978.
- [24] 李媛. GTF2I、GTF2IRD1 和 IL12A 基因多态性与中国汉族人群系统性红斑狼疮的相关性研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2015.
- [25] VAN DER MEULEN TA, HARMSSEN HJM, VILA AV, et al. Shared gut, but distinct oral microbiota composition in primary Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus [J]. *J Autoimmun*, 2019, 97: 77-87. doi: 10.1016/j.jaut.2018.10.009.
- [26] 谢杭谕. 肠道菌群及其代谢产物短链脂肪酸和肠黏膜损伤标记物在 HIV 感染组和健康组的对比研究[D]. 泸州: 西南医科大学, 2017.
- [27] 蒙丹丽, 梁列新, 宋怀宇. 短链脂肪酸在肠道中的生理作用[J]. *中国临床新医学*, 2018, 11(2): 198-202.
- [28] KARAASLAN A, SOYSAL A, KEPENEKLI KE, et al. *Lactococcus lactis* spp *lactis* infection in infants with chronic diarrhea: two cases report and literature review in children [J]. *J Infect Dev Ctries*, 2016, 10(3): 304-307.
- [29] LEE JY, SEO MY, YANG J, et al. Polymicrobial peritonitis with *Lactococcus lactis* in a peritoneal dialysis patient [J]. *Chonnam Med J*, 2014, 50(2): 67-69.
- [30] MIGNACCA SA, DORE S, SPURIA L, et al. Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* in ewes to treat staphylococcal mastitis [J]. *J Med Microbiol*, 2017, 66(12): 1798-1810.
- [31] MIAO M, HAO Z, GUO Y, et al. Short-term and low-dose IL-2 therapy restores the Th17/Treg balance in the peripheral blood of patients with primary Sjögren's syndrome [J]. *Ann Rheum Dis*, 2018, 77(12): 1838-1840.

Effect of *Huoxue Jiedu Formula* (活血解毒方) on Intestinal Flora in NOD Mice

WANG Haiyu¹, ZHANG Yuting¹, BAI Zhiyi¹, LI Yuan¹, WANG Ruoyi¹, WANG Yongfeng¹, LIU Xiaoping², ZHU Yuelan², HOU Xiujuan²

1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029; 2. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Huoxue Jiedu Formula* (活血解毒方, HJF) in the treatment of Sjögren's syndrome. **Methods** Thirty-five NOD mice, a classic animal model of Sjögren's syndrome, were randomly divided into a model group, total glucosides of paeony (TGP) group, and HJF high, moderate and low dose group, with seven mice in each group; and seven C57BL/6J mice were set as normal group. The normal group and the model group were given 10 ml/kg of distilled water by gavage; the TGP group was administered with 234 mg/kg of TGP capsules by gavage, while the HJF high, moderate and low dose group were respectively given 62.4 g/(kg·d), 31.2 g/(kg·d) and 15.6 g/(kg·d) of HJF by gavage. After 8 weeks, the pathological staining of the submandibular glands were observed and scored. Simultaneously, the high-throughput sequencing was used to detect the composition of the intestinal flora and the dominant strains, and the diversity analysis was performed. **Results** Compared to those of the normal group, the pathological score of the submandibular glands of the model group and the TGP group significantly increased ($P < 0.01$); HE staining showed that the exocrine gland structure was damaged, and there

were acinar atrophy with varied degrees and multifocal lymphocytic infiltration in the tissues of the model group; the above-mentioned pathological damages were reduced in all three HJR groups with scarce scattered lymphocyte infiltration unable to gather into a stove, and more reduction was seen in the HJR moderate and high dose group than in the low dose group. The phylum level analysis showed that the model group had decreased Verrucomicrobial abundance and increased TM7 phylum abundance compared to the normal group ($P < 0.05$); the HJF low dose group had increased Deferrobacteria abundance compared to the model group ($P < 0.05$) and the TGP group ($P < 0.05$). The genus level analysis showed that the model group had higher Odobacter abundance and lower Prevotella abundance compared to the normal group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the HJF high dose group had decreased Odobacter abundance compared to the low dose group ($P < 0.01$). Strain screening based on differences between groups showed that the number of dominant strains of the normal group, the model group and the TGP group were 19, 6 and 1, respectively, while that of the HJF low, moderate and high dose groups were 6, 2 and 8. Alpha diversity analysis showed that the model group had decreased Faith_Pd index compared to the normal group ($P < 0.05$), while the HJF low and moderate dose groups had increased Faith_Pd index than the model group ($P < 0.01$). Beta diversity analysis showed that there were significant differences between any two of the six groups in the intestinal flora structure except that between HJF low and moderate dose groups, and that between HJF moderate and high dose groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$).

Conclusion HJF can regulate the intestinal flora structure of the NOD mice, promote the growth of the beneficial bacteria, and accelerate the recovery of the flora, which may explain the mechanism of HJF in the treatment of Sjogren's syndrome.

Keywords Sjogren's syndrome; intestinal flora; *Huoxue Jiedu Formula* (活血解毒方); the submandibular gland; NOD mice

(收稿日期: 2021-05-27; 修回日期: 2021-09-01)

[编辑: 王利芬]

珍贵文献 临床科研必备《中医杂志》光盘合订本 广告

《中医杂志》光盘检索系统收录了 1951 年 ~ 2013 年出版发行的《中医杂志》所有期刊(繁体字已转为简体字)。您可借助计算机阅读收录的任意一篇文章,而且可对光盘进行任意词或多组合条件检索,检索结果可以打印或下载保存。您可以在几秒钟内就能检索到某种疾病、某种疗法或某种药的相关文章,本光盘可按自然年、期排序,方便阅读与保存。1951 年 ~ 1986 年光盘还收录了扫描的原文版面图像。

邮购地址: 北京东直门内南小街 16 号中医杂志社, 邮政编码: 100700

电话: (010) 64035632 联系人: 杨秋雷(请在汇款单附言栏写明购买者的电话)

1951 年 ~ 1986 年光盘合订本每套(4 张光盘) 480 元

1987 年 ~ 1994 年光盘合订本每套(1 张光盘) 260 元

1995 年 ~ 2004 年光盘合订本每套(1 张光盘) 280 元

2005 年 ~ 2013 年光盘合订本每套(1 张光盘) 300 元



欢迎关注《中医杂志》公众号

科技精品光盘全文检索管理系统 3.5 - 《中医杂志》(1987-1994)

系统工具 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

期刊目录

中医杂志. 1987年08期
中医杂志. 1987年09期
中医杂志. 1987年10期
中医杂志. 1987年11期
中医杂志. 1987年12期
中医杂志. 1988年01期
中医杂志. 1988年02期
中医杂志. 1988年03期
中医杂志. 1988年04期
中医杂志. 1988年05期
中医杂志. 1988年06期
中医杂志. 1988年07期
中医杂志. 1988年08期
中医杂志. 1988年09期
中医杂志. 1988年10期
中医杂志. 1988年11期
中医杂志. 1988年12期
中医杂志. 1989年01期
中医杂志. 1989年02期
中医杂志. 1989年03期
中医杂志. 1989年04期
中医杂志. 1989年05期
中医杂志. 1989年06期
中医杂志. 1989年07期
中医杂志. 1989年08期
中医杂志. 1989年09期
中医杂志. 1989年10期
中医杂志. 1989年11期
中医杂志. 1989年12期

1. 潜阳证治
2. 厥证与中风的联系
3. 脉法三论
4. 针灸保健灸法
5. 清热解毒法治寒热证
6. 余无言医方治法选介
7. 中医治疗高热症21例
8. 丁仲山外科医案三则
9. 闭经溢乳综合征证治论
10. 医话二则
11. 甘露消毒丹新用
12. 中药结合治疗皮肤切
13. 失眠从气论治2例
14. 男性不育症从肝肾论治
15. 承值升阳法在针灸
16. 升亢的通应用法
17. 萎缩性胃炎436例中医
18. 中药重法治清毒疫
19. 三种不同治法治疗急
20. 燕翅对老年便秘及睡眠
21. 利胆合剂治疗小儿肝
22. 中药治疗小儿迁延性血
23. 慢性胃炎辨证论治和血
24. 八种经期中药疗效的

