

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.13.014

加减小柴胡汤对胆囊胆固醇结石湿热证模型小鼠回肠组织病理及肠道菌群的影响

闵莉[✉], 王素英, 林雪娟, 丁珊珊, 朱龙, 陈梅妹, 谢玉春

福建中医药大学, 福建省福州市闽侯上街邱阳路1号, 350122

[摘要] **目的** 探讨加减小柴胡汤对胆囊胆固醇结石湿热证模型小鼠的干预作用及可能作用机制。**方法** 将48只小鼠随机分为空白组、模型组、加减小柴胡汤组和熊去氧胆酸组, 每组12只。除空白组外, 其余各组小鼠采用“内湿+外湿+高胆固醇致石饲料”建立胆囊胆固醇结石湿热证小鼠模型。造模成功后, 加减小柴胡汤组小鼠给予浓度为1.17 g/ml的加减小柴胡汤药液0.02 ml/g灌胃, 熊去氧胆酸组小鼠给予浓度为2.5 mg/ml的熊去氧胆酸溶液0.02 ml/g灌胃, 同时空白组和模型组给予0.02 ml/g生理盐水灌胃, 每日1次, 共干预4周。自造模起每周观察记录各组小鼠体质量、饮食量、皮毛、二便等一般情况变化, 造模前后及给药干预后均进行旷场实验(包括水平穿越格子数、直立次数和静止时间)评价小鼠活跃情况; 干预结束后检测胆汁中总胆固醇(TC)、总胆汁酸(TBA)含量; HE染色法观察回肠组织病理学变化; 16S rDNA扩增测序法检测各组小鼠肠道菌群生物多样性。**结果** 干预后与空白组比较, 模型组小鼠水平穿越格子数和直立次数均减少、静止时间均延长, 胆汁内TC含量升高、TBA含量降低($P<0.01$)。与模型组和熊去氧胆酸组比较, 加减小柴胡汤组小鼠水平穿越格子数和直立次数增多、静止时间缩短, 胆汁内TC含量均降低、TBA含量均升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。HE染色显示, 模型组小鼠回肠结构完整性被破坏, 肠绒毛疏松、杂乱、断裂, 固有层明显增厚; 加减小柴胡汤组和熊去氧胆酸组小鼠较模型组肠绒毛密度有所增加, 肠绒毛断裂等状况有所好转, 其中加减小柴胡汤组小鼠回肠组织病理形态改善状况更佳。肠道菌群Alpha多样性分析结果显示, 与空白组比较, 模型组小鼠肠道Chao1、Observed species、Pielou_e、Shannon、Simpson指数均降低($P<0.01$); 加减小柴胡汤组小鼠肠道Shannon、Pielou_e指数明显高于模型组和熊去氧胆酸组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。Beta多样性分析发现, 除模型组与熊去氧胆酸组之间的组间差异小于组内差异、组间差异不明显($P>0.05$)外, 其余各组组间差异均大于组内差异、组间差异显著($P<0.01$)。各组之间在界、门、纲、目、科、属分类学水平总共有66个显著差异菌, 其中属水平有25个。与模型组和熊去氧胆酸组比较, 异杆菌属、乳杆菌属和苏黎世杆菌属为加减小柴胡汤组显著差异菌属。**结论** 加减小柴胡汤可改善胆囊胆固醇结石湿热证模型小鼠活跃程度及湿热证候, 调节脂质代谢, 从而达到利胆消石功效, 其机制可能与改善肠道菌群紊乱及回肠组织病理损伤有关。

[关键词] 胆囊胆固醇结石; 湿热证; 加减小柴胡汤; 肠道菌群; 旷场实验; 回肠组织

胆囊胆固醇结石(cholesterol gallstones, CS)是原发于胆囊内的结石, 其所含的化学成分以胆固醇为主, 是一种世界范围内的多发病。目前现代医学治疗胆固醇结石首选手术治疗^[1]。研究显示, CS患者的肠道微生态处于失衡状态, 菌群失衡导

致胆汁酸和胆固醇代谢紊乱是胆固醇结石发生的重要环节^[2]。中医学称CS为胆石症, 湿热壅滞是胆石症的关键发病基础和重要病理表现之一^[3-4]。前期文献研究结果^[5]显示, 肝胆湿热、胆热湿滞、湿热均是胆石症的临床常见证型。临床研究表明, 大柴胡汤对胆石症湿热证有良好的治疗效果^[6]。我们以《消化系统常见病急慢性胆囊炎、胆石症中医诊疗指南(基层医生版)》^[7]和《胆石症中西医结

基金项目: 国家自然科学基金(81603541); 福建省自然科学基金(2021J01928)

✉ 通讯作者: 44072083@qq.com

合诊疗共识意见(2017年)》^[8]中胆石症肝胆湿热证的推荐方剂加减大柴胡汤作为研究对象,以肠道微生态为切入点,探讨加减大柴胡汤治疗CS湿热证的可能作用机制,为其临床应用提供依据。本研究通过福建中医药大学动物伦理委员会审批(伦理批号为FJTCMIACUC2020071)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级C57BL/6J雄性小鼠51只,6周龄,体质量为18~22 g,由杭州子源实验动物科技有限公司提供,实验动物生产许可证号:SCXK(浙)2019-0004,合格证编号:20201216Abbbb0105000538。小鼠饲养于福建中医药大学SPF级动物房,昼夜12 h/12 h,温度(20±2)℃,湿度40%~60%。普通饲料(饲料中碳水化合物、蛋白质、脂肪、纤维占比分别为60%、22%、10%、8%)由福建中医药大学实验动物中心提供,批号2010220913;高胆固醇致石饲料(饲料成分含全价饲料粉料82.5%、牛油15%、胆固醇2%、胆酸0.5%)由无锡帆泊生物技术有限公司提供,批号20210107。

1.2 药物

加减大柴胡汤组成:北柴胡15 g(批号201101),黄芩10 g(批号201001),厚朴10 g(批号20120102),枳实10 g(批号200831),金钱草15 g(批号20110190),茯苓15 g(批号201124),茵陈15 g(批号200131),郁金15 g(批号200901),大黄6 g(批号201122),炙甘草6 g(批号200901)。药物购自福建中医药大学附属第三人民医院中药房,常规水煎两次后将药液混合并使用旋转蒸发器浓缩至100 ml,最终浓度为含生药量1.17 g/ml。熊去氧胆酸胶囊(250 mg/粒,批号L20182A),Dr. Falk Pharma GmbH公司,将胶囊打开溶于超纯水,配制成浓度为2.5 mg/ml的熊去氧胆酸溶液。

1.3 主要试剂和仪器

总胆固醇(TC)、总胆汁酸(TBA)ELISA试剂盒(江苏酶免实业有限公司,批号均为202101);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号20190430);逆转录试剂盒、TB Green® Premix Ex Taq™(日本Takara公司,批号分别为AK71623A、AK41790A);Soil DNA试剂盒(Omega Bio-Tek公司,批号D5625-01);4%多聚甲醛组织固定液(Biosharp公司,批号70091800)。

LRH-800-GSI型人工气候箱,韶关市泰宏医疗

器械有限公司;EG1150H型生物组织包埋机、RM2245型石蜡切片机,德国Leica公司;Illumina NovaSeq型机器,美国illumina公司;Axio Imager A2型显微镜,德国Carl Zeiss公司。

1.4 分组及干预方法

51只小鼠采用随机数字表法分为空白组12只和造模组39只。空白组小鼠给予普通饲料喂养;造模组小鼠给予高胆固醇致石饲料喂养9周后根据随机数字表选取3只,解剖查看胆囊结石情况,若小鼠胆囊明显增大,胆汁浑浊,肉眼可见泥沙样或砂石样沉淀判断CS模型造模成功^[9]。在造模第10~13周,运用“内湿+外湿+致病因素”制备湿热证动物模型^[10]:小鼠在全天候食用高胆固醇致石饲料的基础上,进入人工气候箱[温度(32±1)℃,湿度95%]每天10 h,在湿热环境内给予20%蔗糖水让其自由饮用,其余时间换成正常饮用水。小鼠出现懒动、好聚堆,哆多,皮毛油腻、粗糙,小便色黄,大便稀软,饮食量减少,体质量增长缓慢甚至负增长等表现,提示湿热证造模成功^[10]。

剩余36只小鼠均造模成功,采用随机数字表法分为模型组、加减大柴胡汤组、熊去氧胆酸组,每组12只。从造模第14周开始,加减大柴胡汤组小鼠给予加减大柴胡汤药液0.02 ml/g灌胃,给药量相当于成人(60 kg)剂量的12倍^[11];熊去氧胆酸组小鼠给予熊去氧胆酸溶液0.02 ml/g灌胃;同时空白组和模型组小鼠给予0.02 ml/g生理盐水灌胃。各组均每日1次,共干预4周。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 一般情况 自造模起每周观察记录小鼠活动度、精神状态、饮食量、体质量、尿液和粪便特征、皮毛等一般情况。

1.5.2 旷场实验 造模前后及给药干预后均进行旷场行为学实验^[12],观察记录小鼠5 min内在规格为50 cm×50 cm×50 cm、底面用黑色签字笔均匀划分成有25个正方形格子的白色场箱内的水平穿越格子数、直立次数和静止时间,以反映小鼠的活跃程度。

1.5.3 肠道微生物群分析 末次给药后禁食不禁水12 h,采用逼迫法或按摩小鼠腹部令其应激排便,每只小鼠需采集2~3粒粪便样本,采集好的样本放入液氮中速冻15 min,然后转移到-80℃冰箱保存。采用Soil DNA试剂盒提取肠道菌群DNA;选用细菌16S rDNA V3-V4区特异性引物(长度

468 bp), 引物序列为: 338F (5'-barcode+ACTCC-TACGGGAGGCAGCA-3'), 806R (5'-GGACTACH-VGGGTWTCTAAT-3') 进行 PCR 扩增; 构建文库, 并对文库进行质检与定量; 在 Illumina NovaSeq 机器上利用逆转录试剂盒(500 循环)进行测序。对原始数据进行初步质量筛查, 然后采用 QIIME2 dada2 分析流程对质控筛选的高质量序列进行去引物、质量过滤、去噪、拼接及去嵌合体等步骤获得特征序列 ASVs, 即把相似度 100% 序列聚类, 并绘制这些序列在样本中的丰度表。用“qiime diversity alpha-rarefaction”方法对特征序列 (ASVs) 的丰度表进行抽平, 获得稀释曲线; 同时进行 Alpha 多样性分析以反映各组内部菌群组成情况, Beta 多样性分析评判各组之间菌群差异是否显著; 通过对抽平后的 ASV/OTU 表格进行统计, 进一步分析比较各组间的物种组成差异, 并采用 LEfSe (LDA Effect Size) 分析寻找各组间的显著差异菌属。

1.5.4 胆汁检测 小鼠脱颈处死, 摘下完整的胆囊, 体视镜拍照后, 收集胆汁存放于 200 μ l 的微型离心管内。根据 ELISA 试剂盒的操作说明, 检测胆汁中 TC 和 TBA 水平。

1.5.5 HE 染色法观察回肠组织病理学变化 解剖后摘取 3 cm 回肠组织并用生理盐水清理干净, 将回肠组织切成形状规整的方形组织块, 泡在 4% 多聚甲醛固定液中。将泡在固定液中的回肠组织进行乙醇梯度脱水、二甲苯透明后, 浸蜡包埋, 切片, 再经脱蜡、水化后, 苏木素染色 5~10 min, 伊红染色 20~30 s, 最后制成封片放于显微镜下观察组织的病理变化。

1.6 统计学方法

使用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。本研究计量资料首先进行正态性检验, 若符合正态分布用均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 若方差齐采用最小显著性差异法 (LSD) 进行两两组间比较, 方差不齐则采用 Games-Howell 法进行组间比较; 若数据不符合正态分布用中位数和四分位数 [$M(P_{25}, P_{75})$] 表示, 采用独立样本的非参数检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组小鼠一般情况比较

与空白组比较, 模型组、加减大柴胡汤组和熊去氧胆酸组小鼠在造模前期 (第 1~9 周) 饮食量较大, 体质量增长较快; 从造模第 8 周开始陆续出现

懒动、好聚堆, 眊多, 皮毛油腻、粗糙, 小便色黄, 大便稀软等现象。造模后期 (第 10~13 周) 3 组小鼠出现精神不振、嗜睡懒动、大便稀软、小便色深黄、饮食量减少、体质量增长缓慢甚至负增长等明显的湿热证候表现。从第 14 周开始, 加减大柴胡汤组小鼠较模型组和熊去氧胆酸组体质量有明显增长趋势, 饮食量有所恢复, 日常活动量增加, 精神状态转好, 皮毛、二便等情况与空白组相近。各组小鼠饮食量、体质量变化分别见图 1、图 2。

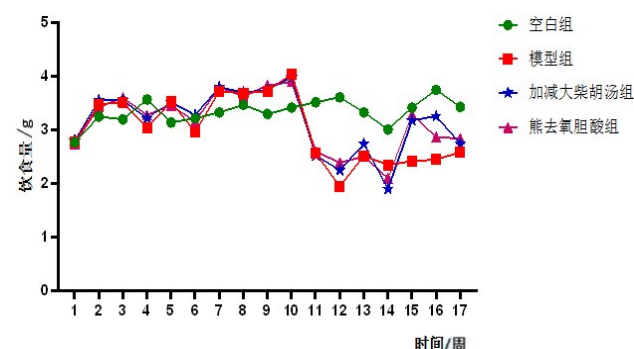


图 1 各组小鼠饮食量变化情况

Figure 1 Changes in diet of mice in each group

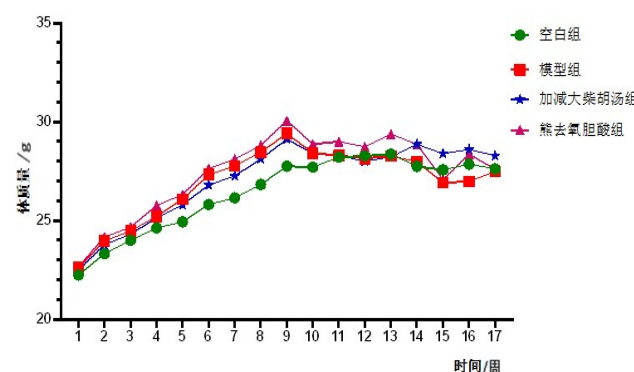


图 2 各组小鼠体质量变化情况

Figure 2 Changes in body mass of mice in each group

2.2 各组小鼠不同时间旷场实验结果比较

表 1~表 3 示, 造模前各组小鼠旷场实验水平穿越格子数、直立次数、静止时间差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。造模后与空白组比较, 模型组、加减大柴胡汤组和熊去氧胆酸组小鼠水平穿越格子数和直立次数均减少, 静止时间均延长 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。干预后与空白组比较, 模型组小鼠水平穿越格子数和直立次数均减少, 静止时间均延长 ($P<0.01$); 与模型组和熊去氧胆酸组比较, 加减大柴胡汤组小鼠水平穿越格子数、直立次数增多, 静止时间缩短 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表 1 各组小鼠不同时间旷场实验水平穿越格子数比较

Table 1 Comparison of the number of grids crossings in the open field test in each group at different times (个, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	造模前	造模后	干预后
空白组	12	121.50±16.06	118.00±11.66	112.20±14.03
模型组	12	115.80±13.92	54.80±13.73 ^{a)}	54.50±12.08 ^{a)}
加减小柴胡汤组	12	115.10±17.85	55.20±11.98 ^{a)}	108.40±37.02 ^{b) c)}
熊去氧胆酸组	12	115.20±22.82	56.50±9.92 ^{a)}	61.70±12.43

注: a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与熊去氧胆酸组比较, $P<0.05$ 。

表 2 各组小鼠不同时间旷场实验静止时间比较

Table 2 Comparison of the resting time in the open field test in each group at different times (s, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	造模前	造模后	干预后
空白组	12	57.40±16.70	119.80±24.72	87.90±14.05
模型组	12	61.40±17.01	150.40±30.42 ^{a)}	189.50±19.51 ^{b)}
加减小柴胡汤组	12	55.70±17.88	147.20±27.26 ^{a)}	107.20±22.63 ^{c) d)}
熊去氧胆酸组	12	61.80±17.27	151.50±24.39 ^{a)}	196.10±23.69

注: a) 与空白组比较, $P<0.05$; b) 与空白组比较, $P<0.01$; c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与熊去氧胆酸组比较, $P<0.01$ 。

表 3 各组小鼠不同时间旷场实验直立次数比较

Table 3 Comparison of the rearing times in the open field test in each group at different times (次, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	造模前	造模后	干预后
空白组	12	30.20±5.51	23.70±6.67	12.60±2.95
模型组	12	28.10±4.68	9.60±4.62 ^{a)}	7.50±3.03 ^{a)}
加减小柴胡汤组	12	27.70±5.81	10.10±4.48 ^{a)}	14.40±6.43 ^{b) c)}
熊去氧胆酸组	12	27.10±5.55	9.30±4.76 ^{a)}	6.80±2.94

注: a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与熊去氧胆酸组比较, $P<0.05$ 。

2.3 各组小鼠胆囊结石情况及胆汁内 TC、TBA 含量比较

空白组小鼠胆汁淡黄、透明, 胆囊较小; 模型组小鼠胆汁浑浊呈黄褐色, 见泥沙样物质沉淀, 胆囊体积增大; 加减小柴胡汤组和熊去氧胆酸组小鼠胆汁虽较空白组浑浊, 但与模型组比较浑浊度有不同程度的减轻、泥沙样物质沉淀消失, 胆囊体积也有缩小, 且加减小柴胡汤组小鼠胆汁较熊去氧胆酸组更清澈透明。表 4 示, 与空白组比较, 模型组小鼠胆汁内 TC 含量升高、TBA 含量降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 加减小柴胡汤组和熊去氧

表 4 各组小鼠胆汁 TC、TBA 含量比较

Table 4 Comparison of TC and TBA contents in bile of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	TC/mm $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	TBA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
空白组	12	5.01±0.52	19.66±0.83
模型组	12	9.48±0.78 ^{a)}	13.00±1.27 ^{a)}
加减小柴胡汤组	12	6.79±0.58 ^{b) c)}	17.67±1.48 ^{b) c)}
熊去氧胆酸组	12	8.00±0.91 ^{b)}	15.49±1.07 ^{b)}

注: TC, 总胆固醇; TBA, 总胆汁酸。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$;

c) 与熊去氧胆酸组比较, $P<0.01$ 。

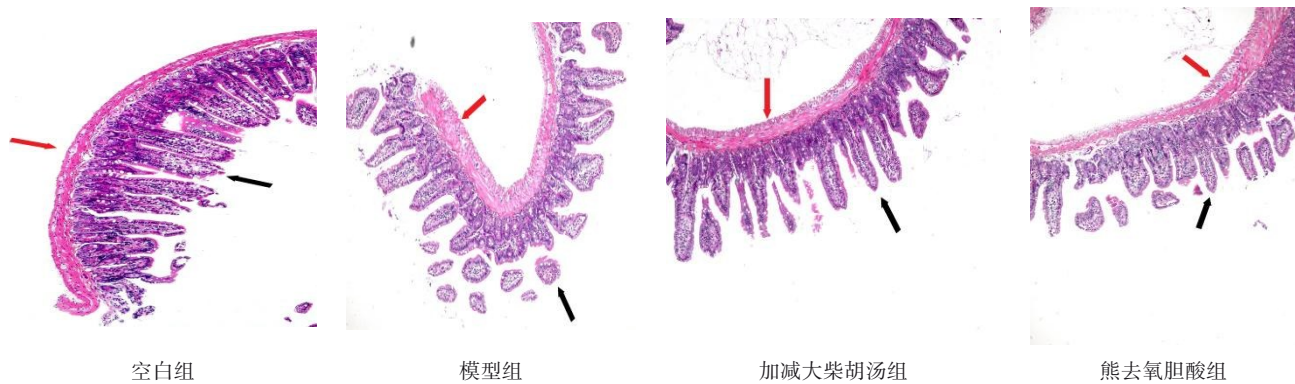
胆酸组小鼠胆汁内 TC 含量均降低、TBA 含量均升高 ($P<0.01$); 与熊去氧胆酸组小鼠比较, 加减小柴胡汤组小鼠胆汁内 TC 含量降低、TBA 含量升高 ($P<0.01$)。

2.4 各组小鼠回肠组织病理学变化比较

空白组小鼠回肠组织形态结构完整, 肠绒毛致密、排列整齐; 模型组小鼠回肠结构完整性被破坏, 肠绒毛疏松、杂乱、断裂, 固有层明显增厚; 与模型组比较, 加减小柴胡汤组和熊去氧胆酸组小鼠肠绒毛密度有所增加, 肠绒毛断裂等状况有所好转, 其中加减小柴胡汤组小鼠回肠组织病理形态改善状况更佳。各组小鼠回肠组织病理形态详见图 3。

2.5 各组小鼠肠道菌群生物多样性检测结果

2.5.1 Alpha 多样性分析结果 表 5 示, 与空白组比较, 模型组小鼠肠道 Chao1、Observed species、Pielou_e、Shannon 与 Simpson 指数均降低 ($P<0.01$); 加减小柴胡汤组小鼠肠道 Shannon、Pielou_e 指数高于模型组和熊去氧胆酸组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 而 Chao1、Observed species、Simpson 指数差异无统计学意义 ($P>0.05$)。



注：图中黑色箭头指示为肠绒毛，红色箭头指示为固有层。

图3 各组小鼠回肠组织病理形态（HE染色，×100）

Figure 3 Histopathological morphology of the ileum of mice in each group

表5 各组小鼠肠道菌群Alpha多样性分析结果

Table 5 Alpha diversity analysis of intestinal flora of mice in each group							[$\bar{x} \pm s / M (P_{25}, P_{75})$]
组别	鼠数	Chao1	Observed species	Pielou_e	Shannon	Simpson	
空白组	12	7977.91±1237.41	6339.71±923.54	0.85 (0.81, 0.85)	10.77 (9.97, 10.89)	1.00 (0.99, 1.00)	
模型组	12	1738.57±520.91 ^{a)}	1375.00±433.83 ^{a)}	0.54 (0.48, 0.59) ^{a)}	5.46 (4.88, 6.25) ^{a)}	0.86 (0.80, 0.90) ^{a)}	
加减小柴胡汤组	12	1861.60±324.25	1567.20±325.15	0.65 (0.58, 0.69) ^{b) c)}	6.75 (5.97, 7.49) ^{b) c)}	0.95 (0.89, 0.96)	
熊去氧胆酸组	12	1525.61±465.49	1168.62±339.05	0.50 (0.47, 0.53)	5.04 (4.61, 5.44)	0.84 (0.81, 0.89)	

注：a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与熊去氧胆酸组比较， $P<0.05$ 。

2.5.2 Beta多样性分析结果 Beta多样性聚焦于样本间的差异，可反映组间或样本之间群落的相似性与差异性，又称生物境间多样性分析。主要通过Adnois分析和Anosim分析判别各组样本之间是否存在显著差异。Adnois分析是基于置换检验的多元方差分析，主要测试各组的组内样本距离与组间的样本距离是否存在差异。本研究中Adnois分析显示 R^2 值为0.60， Pr （ Pr 值代表通过置换检验得到的 P 值）=0.001<0.01，说明目前的分组方式较好，即每个组的组内样本比组间样本更相似。Anosim分析是一种判别组间样本是否存在显著差异的非参数检验方法（ R 取值的范围是-1~1，若 $R>0$ 时，表示组间差异大于组内差异，若 $R<0$ 则代表组内差异大于组间差异）。本研究中经过两两组间比较，发现模型组与熊去氧胆酸组之间的组间差异小于组

内差异，组间差异不明显（ $R<0$ 、 $P>0.05$ ）；其余各组组间差异均大于组内差异，组间差异显著（ $R>0$ 、 $P<0.01$ ）。

2.5.3 各组小鼠肠道菌群门水平物种组成分析结果 各组小鼠肠道菌群在门水平的物种组成上均以厚壁菌门和拟杆菌门为主，其中空白组小鼠拟杆菌门占比84.58%为其绝对优势菌门，厚壁菌门在模型组、加减小柴胡汤组及熊去氧胆酸组中分别占比89.99%、90.49%、93.58%，均为此3组的优势菌门。表6示，与空白组比较，模型组、加减小柴胡汤组及熊去氧胆酸组厚壁菌门相对丰度上调、拟杆菌门相对丰度下调（ $P<0.01$ ），模型组放线菌门相对丰度下调（ $P<0.05$ ）；加减小柴胡汤组及熊去氧胆酸组各菌门相对丰度差异均无统计学意义（ $P>0.05$ ）。

表6 各组小鼠肠道菌群排名前五位的门水平物种相对丰度比较

Table 6 Comparison of the relative abundance of the top five phylum-level species in the intestinal flora of mice in each group							[%, $M (P_{25}, P_{75})$]
组别	鼠数	厚壁菌门	拟杆菌门	变形菌门	放线菌门	脱铁杆菌门	
空白组	12	9.45(6.74, 17.04)	88.08(77.92, 90.93)	0.57(0.34, 0.67)	1.01(0.62, 2.29)	0.00(0.00, 0.00)	
模型组	12	94.27(84.21, 98.58) ^{a)}	3.88(0.90, 12.58) ^{a)}	0.80(0.34, 3.19)	0.28(0.08, 0.54) ^{b)}	0.00(0.00, 0.02)	
加减小柴胡汤组	12	91.65(85.40, 95.78) ^{a)}	3.95(1.97, 5.86) ^{a)}	1.62(0.79, 2.80)	0.88(0.62, 1.84)	0.01(0.00, 0.09)	
熊去氧胆酸组	12	95.75(90.24, 97.06) ^{a)}	1.97(1.17, 3.56) ^{a)}	1.64(1.11, 2.92)	0.30(0.14, 1.12)	0.01(0.00, 0.03)	

注：a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与空白组比较， $P<0.05$ 。

2.5.4 各组小鼠肠道菌群属水平物种组成分析结果 从属水平菌群的相对丰度来看,空白组乳杆菌属、异杆菌属与双歧杆菌属相对丰度分别为6.62%、2.88%和1.40%,是空白组的优势菌属;乳杆菌属、库特氏菌属、异杆菌属是模型组(相对丰度分别为17.03%、14.86%、4.43%)和熊去氧胆酸组(相对丰度分别为14.20%、16.17%、5.32%)的优势菌属;加减大柴胡汤组中乳杆菌属、异杆菌属、苏黎世杆菌属相对丰度依次为43.12%、29.04%和2.93%,为该组的优势菌属。表7示,与空白组比较,模型组小鼠肠道菌群中库特氏菌属相对丰度上调,苏黎世杆菌属和双歧杆菌属相对丰度均下调($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,加减大柴胡汤组异

杆菌属、苏黎世杆菌属、双歧杆菌属相对丰度均上调,库特氏菌属相对丰度下调($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与熊去氧胆酸组比较,加减大柴胡汤组乳杆菌属、异杆菌属和苏黎世杆菌属相对丰度均上调,库特氏菌属相对丰度下调($P<0.01$)。

2.5.5 菌群物种差异分析 对各组之间肠道菌群进行物种差异分析并寻找差异性生物标志物,采用LEfSe分析方法。从LDA值 >3 标准来看,4组之间在界、门、纲、目、科、属分类学水平总共有66个显著差异菌,其中属水平有25个。为进一步明确造模及干预用药对菌群的影响,故对各组进行两两比较分析。图4-图7示,空白组与模型组比较(LDA值 ≥ 4),S24_7菌科为空白组的显著差异物

表7 各组小鼠肠道菌群排名前五位的属水平物种相对丰度比较

Table 7 Comparison of the relative abundance of the top five genus-level species in the intestinal flora of mice in each group

[%, $M(P_{25}, P_{75})$]

组别	鼠数	乳杆菌属	异杆菌属	库特氏菌属	苏黎世杆菌属	双歧杆菌属
空白组	12	4.02(1.30,8.37)	1.56(0.72,3.58)	0.00(0.00,0.02)	0.02(0.01,0.04)	0.95(0.49,2.25)
模型组	12	6.39(3.87,22.47)	4.68(0.90,6.52)	17.80(6.50,22.30) ^{a)}	0.00(0.00,0.00) ^{b)}	0.06(0.038,0.21) ^{a)}
加减大柴胡汤组	12	43.08(27.39,63.92) ^{c)}	26.02(16.87,41.20) ^{c)e)}	0.02(0.01,0.16) ^{c)e)}	0.03(0.013,5.02) ^{d)e)}	0.62(0.29,1.11) ^{d)}
熊去氧胆酸组	12	2.72(1.57,26.85)	2.09(0.57,6.69)	17.06(10.66,21.12)	0.00(0.00,0.00)	0.07(0.03,0.26)

注: a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与空白组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与模型组比较, $P<0.05$; e) 与熊去氧胆酸组比较, $P<0.01$ 。

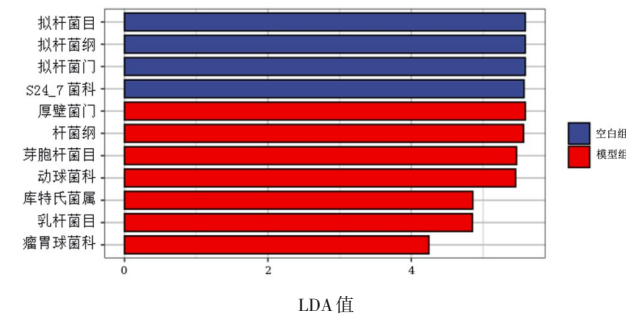


图4 空白组与模型组小鼠肠道菌群组间显著差异菌比较

Figure 4 Comparison of significantly different bacteria in the intestinal flora between the blank group and the model group mice

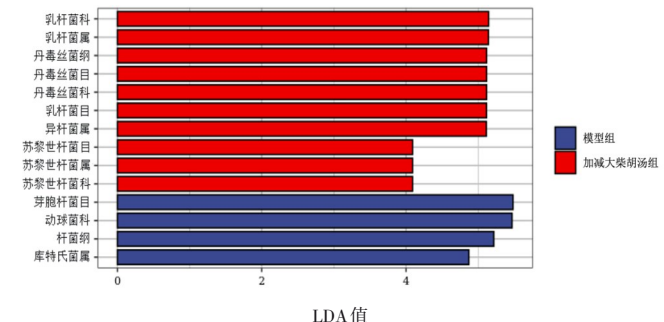


图5 模型组与加减大柴胡汤组小鼠肠道菌群组间显著差异菌比较

Figure 5 Comparison of significantly different bacteria in the intestinal flora between the model group and the MDD group mice

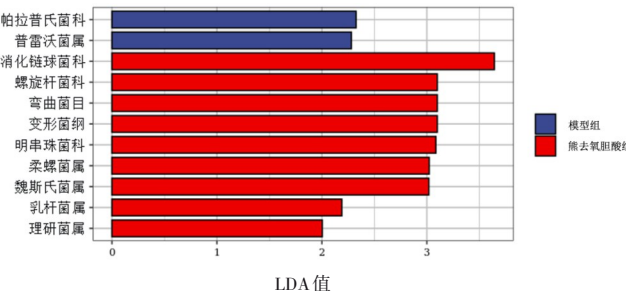


图6 模型组与熊去氧胆酸组肠道小鼠菌群组间显著差异菌比较

Figure 6 Comparison of significantly different bacteria in the intestinal flora between the model group and the ursodeoxycholic acid group mice

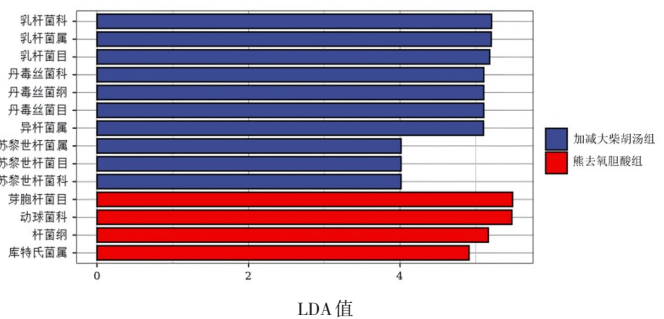


图7 加减大柴胡汤组与熊去氧胆酸组小鼠 LDA 值肠道菌群组间显著差异菌比较

Figure 7 Comparison of significantly different bacteria in the intestinal flora between the MDD group and the ursodeoxycholic acid group mice

种, 模型组的瘤胃球菌科与库特氏菌属为其显著差异物种; 加减大柴胡汤组与模型组、熊去氧胆酸组比较 (LDA 值 ≥ 4), 厚壁菌门的异杆菌属、乳杆菌属和苏黎世杆菌属为加减大柴胡汤组显著差异菌属, 而模型组与熊去氧胆酸组的显著差异菌属均为厚壁菌门的库特氏菌属。模型组与熊去氧胆酸组比较 (LDA 值 ≥ 2), 拟杆菌门的普雷沃菌属为模型组的显著差异菌属, 而厚壁菌门的乳杆菌属与魏斯氏菌属、拟杆菌门的理研菌属为熊去氧胆酸组的显著差异菌属。

3 讨论

中医学认为, 外感湿热或饮食不节耗伤脾胃, 使其运化不及, 蕴生湿热, 湿热熏蒸肝胆, 肝胆疏泄失常, 胆汁淤积, 浓缩成石, 可见湿热是胆石症发生发展的关键病机。因此, 本病的治疗以清热利湿、利胆排石为主。本研究选用的加减大柴胡汤是胆石症湿热证诊疗指南的推荐用药^[7]。大柴胡汤源自《伤寒论》, 是和解少阳、通下阳明的代表方。加减大柴胡汤中减去大柴胡汤方中柔肝缓急之白芍, 和胃降逆之半夏和生姜、大枣, 加入厚朴、金钱草、茯苓、茵陈、郁金和炙甘草。方中柴胡、郁金归肝、胆经以疏肝之郁滞, 配以黄芩、茵陈清利脾胃及小肠之湿热; 轻用大黄以泄阳明热结, 配以枳实、厚朴燥湿行气, 金钱草重用可加重清热祛湿、消石排石之效; 茯苓利水渗湿又可健脾和胃, 炙甘草调和诸药。全方兼顾肝、胆、脾、胃、小肠, 既疏利肝胆之郁滞, 又荡涤胃肠之结滞, 是清热祛湿、利胆消石之佳剂。

湿热证模型的评判尚无规范化标准, 目前主要是通过观察动物外在证候表现来判断^[13]。旷场实验常用于研究动物的自发活动与探索行为情况, 可反映动物的精神状态和活跃程度^[14]。本次研究将旷场实验中统计的水平穿越格子数、直立次数、静止时间作为小鼠湿热证候“精神不振, 神疲懒动”的辅助评判指标; 同时, 自造模起每周观察记录各组小鼠的精神状态、活动度、体质量、饮食、皮毛、二便等一般情况, 以评判湿热证模型是否复制成功。结果显示, 与空白组比较, 造模组小鼠在造模第8周开始陆续出现精神不振, 嗜睡懒动, 常聚堆缩在角落、活动减少, 皮毛油腻、粗糙, 哆多, 小便色黄, 大便稀软, 体质量减轻, 饮食量减少等明显的湿热证候表现, 从外在证候表现判断湿热证造模成功。

胆汁中胆固醇含量增多是CS突出的病理表现, 也是其重要的发病基础之一, 而进入胆囊的胆汁内胆固醇含量增多, 胆汁酸含量便相对减少。有研究^[15]发现, 胆固醇结石的家兔胆汁内TC含量显著升高, TBA含量则显著降低, 经熊去氧胆酸治疗后, 家兔胆汁内TC含量降低、TBA含量升高。本研究中模型组和熊去氧胆酸组小鼠胆汁成分变化结果与上述研究结果一致, 且与熊去氧胆酸组比较, 加减大柴胡汤组小鼠胆汁成分更趋近于空白组, 说明加减大柴胡汤通过清热祛湿可促使肝胆疏泄、脾胃纳运协调, 从而改善脂质代谢以达到更好的利胆消石之效。

小肠是胆囊排泄胆汁的场所, 也是胆固醇吸收的重要场所^[16]。湿热壅滞令脾胃纳运失职, 清浊胶着, 滞碍小肠分清泌浊, 肥甘之物久留胃肠, 肠腑不通, 则损伤肠腑。有研究^[17]发现, 高脂高胆固醇饮食喂养的C57BL/6J小鼠的小肠肠壁固有层水肿、增厚, 肠绒毛严重短缩融合、脱落。本研究中, 模型组小鼠回肠绒毛疏松、杂乱、断裂, 固有层明显增厚, 与上述研究报道一致。熊去氧胆酸口服后主要吸收部位在小肠^[18], 故熊去氧胆酸组小鼠回肠受损的情况有所好转; 加减大柴胡汤组小鼠回肠绒毛密度增加, 肠绒毛断裂等状况改善更为明显, 也说明加减大柴胡汤对回肠组织病理改变修复作用更明显。

CS湿热证模型小鼠长期在肥甘厚味和外部湿热环境的影响下, 使湿热蕴结于内、肠道微生态环境发生改变。实验结果显示, 与正常组小鼠比较, 模型组小鼠肠道菌群丰度和多样性均减少, 厚壁菌门相对丰度显著高于空白组。研究^[17]发现, 肥胖人群拟杆菌门所占比例相对较低, 厚壁菌门为其优势菌门, 相比于体形较瘦人群来说, 厚壁菌门/拟杆菌门比值较高。本研究中造模组小鼠持续食用2%胆固醇高脂致石饲料, 前9周体质量逐步升高且增长趋势明显高于空白组, 侧面印证了厚壁菌门升高与肥胖的相关性, 而肥胖、超重是导致胆石症发生的重要危险因素^[19]。双歧杆菌属是放线菌门的益生菌, 被广泛制作成益生菌制剂用于维持肠道微生态平衡^[20], 而高脂饮食可使肠道内双歧杆菌属丰度降低, 故使用双歧杆菌制剂对于改善脂代谢、肥胖有重要意义^[21-22]。本研究中经加减大柴胡汤干预后, 双歧杆菌属丰度明显上调, 提示加减大柴胡汤能够提高肠道有益菌, 有效改善CS湿热证的肠道微环境。

综上所述,大柴胡汤可改善CS湿热证模型小鼠活跃程度及湿热证候,调节脂质代谢,从而达到利胆消石功效,其机制可能与改善肠道菌群紊乱及回肠组织病理损伤有关。但此次实验未能深入研究特异性肠道菌群及其代谢产物,将在今后运用代谢组学、粪移植等技术进一步深入研究。

参考文献

- [1]徐流波,马宁,王勋,等.胆囊胆固醇结石的成因及发病机制研究进展[J].山东医药,2010,50(10):114-115.
- [2]王强,薛东波.肠道菌群通过影响胆汁酸代谢参与胆囊胆固醇结石形成[J].肝胆胰外科杂志,2020,32(1):6-8,25.
- [3]蒋梦婷.基于数据挖掘的周仲瑛教授胆石症证治研究[D].南京:南京中医药大学,2019.
- [4]范明明,张嘉裕,张湘龙,等.疏肝泄热法治疗胆石症临证经验[J].中医药信息,2020,37(6):72-74.
- [5]章小燕,陈启亮,闵莉.基于数据挖掘的胆石症患者证素及文献规律研究[J].云南中医学院学报,2018,41(6):40-43.
- [6]周群,王毅兴,刘平,等.胆石症的中医药治疗研究进展[J].临床肝胆病杂志,2018,34(11):2458-2463.
- [7]时昭红,任顺平,唐旭东,等.消化系统常见病急慢性胆囊炎、胆石症中医诊疗指南(基层医生版)[J].中华中医药杂志,2020,35(2):793-800.
- [8]李军祥,陈詒,梁健.胆石症中西医结合诊疗共识意见(2017年)[J].中国中西医结合消化杂志,2018,26(2):132-138.
- [9]毛丽梅,戴建华,张晏苗,等.小鼠胆囊胆固醇结石模型的建立[J].基础医学,2014,4(6):30-32,61.
- [10]王素英,闵莉.胆囊胆固醇结石湿热证小鼠造模方法的研制与评价[J].世界科学技术-中医药现代化,2021,23(12):4460-4469.
- [11]秦川.实验动物学[M].北京:中国协和医科大学出版社,2016:167.
- [12]董瑞,毕燕琳,王明山.旷场实验在鼠行为学研究中的应用[J].国际麻醉学与复苏杂志,2020,41(5):535-540.
- [13]陈佳美,朱青,朴胜华,等.湿热证动物模型造模方法的文献挖掘研究[J].中国中医基础医学杂志,2021,27(9):1399-1404.
- [14]蔡思琪,李沅衡,黎嘉,等.鼠类行为学实验方法研究进展[J].医学综述,2018,24(5):916-920.
- [15]阎姝,崔乃强,方步武,等.茵陈合剂对家兔胆固醇结石成石性胆汁分泌的影响[J].中国中西医结合外科杂志,2008,14(1):50-55.
- [16]JIANG ZY, JIANG CY, WANG L, et al. Increased NPC1L1 and ACAT2 expression in the jejunal mucosa from Chinese gallstone patients[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 379(1):49-54.
- [17]张薇.谷物膳食纤维对高脂高胆固醇饮食小鼠肠道胆固醇代谢的影响[D].苏州:苏州大学,2016.
- [18]王丽华.熊去氧胆酸(优思弗)的药物分析[J].中外健康文摘,2013(38):180-181.
- [19]DI CA, GABRIELLA G, GEMA F, et al. The role of diet in the pathogenesis of cholesterol gallstones [J]. Curr Med Chem, 2019, 26(19):3620-3638.
- [20]BINDA C, LOPETUSO LR, RIZZATTI G, et al. Actinobacteria: a relevant minority for the maintenance of gut homeostasis[J]. Dig Liver Dis, 2018, 50(5):421-428.
- [21]王伯韬.青春双歧杆菌对高脂饮食引发肥胖症的缓解作用与机制研究[D].无锡:江南大学,2021.
- [22]钟明月,刘春妍,颜妍,等.乳双歧杆菌V9对高脂饮食诱导的NAFLD大鼠的改善作用[J].生物技术通报,2022,38(3):181-187.

Effect of Modified Dachaihu Decoction (加减大柴胡汤) on Ileum Histopathology and Intestinal Flora in Cholesterol Gallstones Mice with Damp-heat Syndrome

MIN Li, WANG Suying, LIN Xuejuan, DING Shanshan, ZHU Long, CHEN Meimei, XIE Yuchun

Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 350122

ABSTRACT Objective To investigate the therapeutic effect of *Modified Dachaihu Decoction* (加减大柴胡汤, MDD) on cholesterol gallstones (CS) mice with damp-heat syndrome and the possible mechanism. **Methods** Forty-eight mice were randomly divided into blank group, model group, MDD group and ursodeoxycholic acid group, with 12 mice in each group. Except for the blank group, the other three groups were administered with “internal damp + external damp+ high cholesterol stone-inducing diet” to establish the CS damp-heat syndrome mouse model. After successful modeling, MDD group and ursodeoxycholic acid group were given 0.02 ml/g of MDD at a concentration of 1.17 g/ml and 0.02 ml/g of ursodeoxycholic acid solution at a concentration of 2.5 mg/ml by gavage, respectively, while the model group and blank group were given 0.02 ml/g of normal saline by gavage, once daily, for a total of 4

weeks. The general changes of body mass, diet, fur, stool, urine and other conditions of mice in each group were observed and recorded every week since the establishment of the model. Open field test including the number of crossings, the rearing times and resting time was performed to measure the activity of mice in each group before and after modeling and after treatment. After treatment, the contents of total cholesterol (TC) and total bile acid (TBA) in bile were detected; hematoxylin and eosin (HE) staining was used to observe the histopathological changes of the ileum; and 16S rDNA amplification sequencing was used to detect intestinal flora biodiversity in each group. **Results** Compared to the blank group, the mice in the model group had decreased number of crossings and rearing times, prolonged resting time, increased TC content in bile and decreased TBA content ($P < 0.01$). Compared to the model group and ursodeoxycholic acid group, the MDD group had increased number of crossings and rearing times, shortened resting time, decreased TC content in bile and increased TBA content ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). HE staining showed that the structural integrity of the ileum was destroyed in the model group, while the intestinal villi were loose, messy and broken, and the lamina propria was significantly thickened. Compared to those in the model group, the density of intestinal villi of mice was increased, while the conditions of intestinal villi rupture were improved in the MDD group and ursodeoxycholic acid group, and the pathological morphology of ileum was improved more obviously in the MDD group. Alpha diversity analysis showed that mice in the model group had decreased intestinal Chao1, Observed species, Pielou_e, Shannon, and Simpson indexes than the blank group ($P < 0.01$), and the MDD group had increased intestinal Shannon and Pielou_e indexes than the model group and ursodeoxycholic acid group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Beta diversity analysis showed that there were no significant differences between model group and ursodeoxycholic acid group which was no larger than the within-group difference ($P > 0.05$), and significant differences between other groups that larger than within-group difference ($P < 0.01$). There were 66 significantly different bacteria among the four groups of mice at the taxonomic level of kingdom, phylum, class, order, family and genus, of which 25 were at the genus level. Compared to the model group and ursodeoxycholic acid group, *Heterobacterium*, *Lactobacillus* and *Zurichella* were significantly different genera in the MDD group. **Conclusion** MDD can improve the activity level and damp-heat syndrome and regulate lipid metabolism in CS mice with damp-heat syndrome, so as to promote gallbladder function and remove stones. The mechanism may be related to improving intestinal flora disorder and ileal tissue pathological damage.

Keywords cholesterol gallstones; damp-heat syndrome; *Modified Dachaihu Decoction* (加减小柴胡汤); intestinal flora; open field experiment; ileum tissue

(收稿日期: 2022-11-10; 修回日期: 2023-02-28)

[编辑: 邓媛]

读者·作者·编者

稿件中数字的用法

稿件中用于表示数量的数字一般应使用阿拉伯数字。在表示数值的范围时,可采用浪纹式连接号“~”或连接号“-”。前后两个数值的附加符号或计量单位相同时,在不造成歧义的情况下,前一个数值的附加符号或计量单位可省略。如果省略数值的附加符号或计量单位会造成歧义,则不应省略。如:100~150 kg, 2亿~3亿(不能写为2~3亿)、15%~30%(不写为15~30%)、 $4.5 \times 10^4 \sim 5.5 \times 10^4$ (不能写为4.5~5.5 $\times 10^4$)。

在某些特定情况下应使用汉字数字。干支纪年、农历月日、历史朝代纪年及其他传统上采用汉字形式的非公历年等,应采用汉字数字,如丙寅年三月十五日,正月初八,清咸丰十年九月二十日,日本庆应三年。数字连用表示的概数、含“几”的概数应采用汉字数字,如三四个月,四十五六岁,十几,几分之一。数字作为词素构成定型词、词组、惯用语、缩略语或具有修辞色彩的词句,应使用汉字,如一氧化碳,“十一五”规划,十二指肠等。

(本刊编辑部)