

· 临床论著 ·

健脾化滞方对脾虚湿热型轻中度溃疡性结肠炎患者
肠道菌群及血清炎症因子的影响

陈 亮 顾庆华 景 珊 杨 芳 许琰杰 徐 逸

摘要 **目的** 观察健脾化滞方对脾虚湿热型溃疡性结肠炎(UC)患者治疗前后肠道差异菌属变化,结合血清学指标探讨其作用机制。**方法** 选取门诊 2016 年 8 月—2017 年 6 月诊治的 36 例脾虚湿热型(轻中度慢性复发型)UC 患者并另选 15 名健康者。患者组给予健脾化滞丸 10 g,每天 3 次,连续 4 周,检测健康者及患者治疗前后白细胞(WBC)、C-反应蛋白(CRP)、血沉(ESR)的水平,比较各组血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 10(IL-10)、IL-12、IL-23、Toll 样受体 4(TLR4)的表达水平,运用 16S rDNA 测序与技术分析健康者群及脾虚湿热型 UC 患者治疗前后肠道粪便菌群变化。**结果** 与治疗前比较,患者治疗后 ESR、TNF- α 、IL-12、IL-23 降低($P<0.01$, $P<0.05$), IL-10 表达升高($P<0.05$),其他指标表达比较差异无统计学意义($P>0.05$)。与治疗前比较,患者治疗后肠道菌群 OTU 数量明显增多,在科水平上巴斯德氏菌科、肠杆菌科相对表达含量下降,普雷沃氏菌科、氨基酸球菌科比例上升。在属水平上巨球形菌属、副沙门氏菌属、厌氧菌属、毛螺菌属丰度下降,巨细胞菌属、氨基酸球菌属比例上升。在种水平上脆弱拟杆菌、大肠杆菌志贺菌属 *g_Escherichia-Shigella_Unclassified*、厌氧菌属下的 *g_Anaerostipes_Unclassified* 比例下降,巨单胞菌属 *g_Megamonas_Unclassified*、氨基酸球菌属下的 *g_Acidaminococcus_Unclassified* 比例上升,且治疗后菌群组成结构、丰度趋近于健康组。**结论** 健脾化滞方对脾虚湿热型 UC 患者具有调节肠道菌群结构,增加拟杆菌丰度,减少致病菌繁殖作用,并调节患者血清中炎症因子的表达,改善局部免疫平衡。

关键词 健脾化滞方;溃疡性结肠炎;肠道菌群;白细胞介素 10;肿瘤坏死因子 α ;Toll 样受体 4;中药

Effect of Jianpi Huazhi Recipe on Intestinal Microflora and Serum Inflammatory Factors in Mild-Moderate Ulcerative Colitis Patients with Pi Deficiency and Dampness-Heat Syndrome

CHEN Liang, GU Qing-hua, JING Shan, YANG Fang, XU Yan-jie, and XU-Yi Department of Gastroenterology, Nantong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nantong Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu (226000)

ABSTRACT **Objective** To observe the changes of intestinal flora in ulcerative colitis (UC) patients with Pi deficiency and dampness-heat syndrome (PDDHS) treated with Jianpi Huazhi Recipe (JPHZR) before and after treatment, and to explore its mechanism combined with serological indexes. **Methods** Totally 36 UC outpatients with PDDHS (mild-moderate, chronic recurrence) from August 2016 to June 2017 and healthy participants (15 cases) were selected. The patient group was given 10 g Jianpi Huazhi Pill 3 times a day for 4 weeks. The levels of white blood cell (WBC), C-reactive protein (CRP) and erythrocyte sedimentation rate (ESR) were detected in healthy participants and patients before and after treatment. The expression levels of tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin-10 (IL-10), IL-12, IL-23, and Toll like receptor 4 (TLR4) were compared in each group. The changes of intestinal fecal flora in healthy participants and UC patients with PDDHS before and after treatment

基金项目:南通市卫计委科技项目课题资助(No. WQ2016053);南通市卫计委青年科研基金项目(No. WKZL2018031);南通市青年医学人才项目[No. 079 (2016 年-2020 年)]

作者单位:南通市中医院南京中医药大学南通附属医院脾胃病科(江苏 226000)

通讯作者:徐 逸, Tel: 0513-85126363, E-mail: xuyi412@163.com

DOI: 10.7661/j.cjm.20230410.043

were analyzed using 16S rDNA sequencing and technology. **Results** Compared with those before treatment, ESR, TNF- α , IL-12, and IL-23 decreased after treatment ($P<0.01$, $P<0.05$), IL-10 expression increased ($P<0.05$), there was no significant difference in other indicators ($P>0.05$). Compared with that before treatment, the number of intestinal flora OTU in patients increased significantly after treatment. At the family level, the relative expression content of *Pasteurellaceae* and *Enterobacteriaceae* decreased, and the proportion of *Prevotellaceae*, and *Acidaminococcaceae* increased. At the genus level, the abundance of *Megasphaera*, *Parasalmonella*, *Anaerostipes*, and *Lachnospira* decreased, while the proportion of *Megamonas* and *Acidaminococcus* increased. At species level, the proportion of *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli* and *Shigella* _*Escherichia-Shigella*_Unclassified, *Anaerostipesg* _*Anaerostipes*_Unclassified decreased, and g _*Megamonas*_Unclassified belongs to *Macromonasspp*, g _*Acidaminococcus*_Unclassified of amino acid cocci increased, and the composition, structure and abundance of flora after treatment tended to be similar to the healthy group. **Conclusion** JPHZR could regulate the intestinal flora structure, increase the abundance of *Bacteroides*, reduce the reproduction of pathogenic bacteria, significantly regulate the expression of inflammatory factors in patients' serum, and improve the local immune balance in UC patients with PDDHS.

KEYWORDS Jianpi Huazhi Recipe; ulcerative colitis; intestinal flora; IL-10; TNF- α ; TLR4; Chinese herbal medicine

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是以腹痛、腹泻、黏液脓血便、里急后重等为主要症状, 以结肠黏膜及黏膜下层的炎症、溃疡形成为病理特点的一种慢性非特异性消化道疾病。UC 病程较长, 病变范围广泛, 病情反复发作, 慢性炎症和上皮细胞周转增加, 导致低、高级别异常增生, 可能进一步转化为结肠炎相关的结直肠癌 (colitis associated CRC, CAC) [1]。在我国随着人们生活水平的提高, 生活习惯及饮食结构的改变, UC 的发病率呈明显上升趋势, 有研究表明, 在中国患病率约为 $11.62/10^5$ [1, 2]。因此, 积极防治 UC, 具有重要的社会和经济意义。目前治疗 UC 的西医手段不管是糖皮质激素、5-氨基水杨酸制剂 (美沙拉嗪、颇得斯安等)、免疫抑制剂 (硫唑嘌呤、6-巯基嘌呤、环孢素等), 还是生物制剂 (针对肿瘤坏死因子的英夫利昔单抗、阿达木单抗、戈利木单抗、赛妥珠单抗; 针对整合素的维多珠单抗; 针对 Janus 激酶 / 信号转导与转录激活子通路的托法替尼; 针对白细胞介素 12/23 的优特克单抗等) 等, 其疗效多不确定, 且价格昂贵, 长期使用不良反应较大 [3]。而中药具有不良反应少、多途径、多靶点的优势特点, 切中 UC 复杂的病理变化。中医药治疗 UC 体现“天人合一”整体观, 多维度诊疗模式, 减少了患者经济负担, 提高了其生活质量。目前观察研究发现复方、单方均是疗效确切, 中医药改善体质, 防治 UC 复发 [4, 5]。健脾化滞方本于 UC 本虚标实的基本病机而立, 在临床使用中具有明显改善患者临床症状、减轻肠道炎症反应的治疗效果 [6-8]。而越来越多的研究表明肠道微生态对人体健康起着多维度、动态、复杂而广泛的影

响, 健脾化滞方对 UC 患者肠道菌群的影响从未有过研究报道。本研究基于肠道菌群及血清炎症分子对健脾化滞方治疗 UC 的作用机理展开进一步的探讨。

资料与方法

1 诊断标准

1.1 西医诊断标准 参照中华医学会消化病学分会炎症性肠病学组《炎症性肠病诊断与治疗的共识意见 (2012 年·广州)》[9], 表现为腹泻, 黏液脓血便伴或不伴有不同程度的腹痛腹胀、里急后重等全身症状, 也可出现涉及眼、口、关节、皮肤等其他部位的肠外表现, 并结合电子结肠镜检查 and 黏膜组织学检查确诊为 UC。临床症状可持续或反复发作, 病程多在 4~6 周以上。

1.2 中医诊断标准 参照《溃疡性结肠炎中医诊疗共识意见》[10], 中医辨证分型为脾虚湿热型, 主要临床表现为: 大便溏薄, 伴有黏液脓血, 里急后重, 口苦黏腻, 乏力, 舌质淡红或红, 苔薄黄腻, 或有齿痕, 脉细滑或细弱。

2 纳入标准 (1) 符合 UC 的西医诊断标准, 病情分期为轻中度活动期 (参考改良 Truelove 和 Witts 疾病严重程度分型、评估 UC 活动性的改良的 Mayo 评分系统 [9]); (2) 中医辨证: 脾虚湿热证; (3) 年龄 18~75 岁, 性别不限; (4) 自愿受试, 签署知情同意书。

3 排除标准 排除细菌性痢疾、阿米巴痢疾、慢性血吸虫病、肠结核等感染性结肠炎以及克罗恩病 (Crohn's disease, CD)、缺血性结肠炎、放射性结

肠炎等疾病。并排除 UC 合并艰难梭菌或巨细胞病毒 (cytomegalovirus, CMV) 感染。

4 一般资料 筛查 2016 年 8 月—2017 年 6 月南通市中医院脾胃科门诊 UC 患者 150 例, 将符合慢性复发型活动期和慢性持续型轻、中度 UC 患者 36 例作为试验对象, 并以 15 名健康者作为正常组。健脾化滞丸治疗 4 周后, 脱落患者 12 例。最后纳入分析前后治疗对照的患者组为 24 例。正常组男性 4 名, 女性 11 名, 年龄 28~70 岁, 平均 (39.40 ± 11.95) 岁, 患者组男性 15 例, 女性 9 例, 年龄 26~72 岁, 平均 (45.50 ± 12.94) 岁, 两组基线资料比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 具有可比性。本研究经南通市中医院伦理委员会批准 (No. 通中院 [2017] 字 004)。

5 治疗方法 轻、中度 UC 患者予本院院内制剂健脾化滞丸 10 g, 每天 3 次饭后服用 (批号: 苏药制字 Z04001365, 其方组成为: 炒白术 10 g 黄连 3 g 槟榔 10 g 炒枳壳 10 g 厚朴 10 g 炮姜 6 g 煨木香 10 g 莪术 10 g 炒山楂 10 g 凤尾草 20 g 建曲 10 g 陈皮 5 g)。疗程为 4 周。均告知患者治疗过程中勿再加用任何益生菌 (包括本院常用的复合乳酸菌、地衣芽孢杆菌、双歧杆菌等), 患者均做到了严格执行, 最终纳入统计的患者均未有使用任何抗生素。

6 观察指标及方法

6.1 血常规、血沉 (erythrocyte sedimentation rate, ESR) 及 C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 检测 采集健康人群及 UC 患者治疗前后晨起空腹血样进行全血检测。实验由本院检验科全自动生化仪完成。

6.2 血清 IL-10、IL-12、IL-23、TLR4、TNF- α 水平检测 收集健康人群及 UC 患者治疗前后清晨空腹的外周静脉血 5~6 mL, 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血清, 取其上清液, 并置于 -80 °C 冰箱中保存, ELISA 法进行统一检测。IL-10 ELISA 试剂购自 Abcam (ab46034, Lot: GR3175494-5), IL-12 ELISA 试剂购自 Abcam (ab46037, Lot: GR3222409-1), IL-23 ELISA 试剂购自 Abcam (ab64708, Lot: GR3176515-4), TLR-4 ELISA 试剂购自 Raybio (ELH-TLR4, Lot: 051118 2028), TNF- α ELISA 试剂购自 Abcam (ab181421, Lot: GR3218652-1), 操作过程中严格按照仪器相关操作标准和试剂盒说明书进行。

6.3 肠道菌群的检测 收集健康人群及患者治疗前后晨起新鲜粪便, 置于无菌冻存盒中, 置于

-80 °C 冰箱中保存。样本收集完毕后干冰托运至苏州。粪便细菌基因组 DNA 的提取、测序由苏州智核生物医药科技有限公司完成。

6.3.1 材料 选择了 24 例患者进行了服药前后的粪便的取样, 并选择了 15 名健康者的粪便样本作为对照, 分别记为 N 为健康组, B 为服药前, A 为服药后。

6.3.2 16S rDNA 测序 提取样品总 DNA 后, 使用 Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA) 检测 DNA 样品的浓度, 使用 MetaVx 文库构建试剂盒 (Inc., South Plainfield, NJ, USA) 构建测序文库。以 30~50 ng 总 DNA 为模板, 利用包含 “CCTACGGRRBGCASCAGKVRVGAAT” 序列的上游引物和包含 “GGACTACNVGGGTWTCTAATCC” 序列的下游引物扩增 V3 和 V4 区序列。另外, 通过 PCR 向 16S rDNA 的 PCR 产物末端加上带有 Index 的接头, 以便进行 NGS 测序。

使用 Agilent 2100 生物分析仪 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) 检测文库质量, 并且通过 Qubit2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA) 检测文库浓度。DNA 文库混合后, 按 Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) 仪器根据说明书进行 PE250/300 双端测序 (具体平台以合同为准), 由 MiSeq 自带的 MiSeq Control Software (MCS) 读取序列信息, 结果以 FASTQ (简称为 fq) 文件格式存储, 其中包含测序序列 (Reads) 的序列信息以及其对应的测序质量信息。

6.3.3 数据分析 根据 PE (paired end, 双端配对 reads 之间的 Overlap 关系, 将测序得到的双端序列数据拼接 (Merge) 成一条序列 Tags, 同时对 Reads 的质量和 Merge 的结果进行质控过滤。主要有如下 3 个步骤: (1) PE reads 拼接: 使用 FLASH v1.2.7 软件, 通过 overlap 对每个样品的 reads 进行拼接, 得到的拼接序列即原始 Tags 数据 (Raw Tags); (2) Tags 过滤: 使用 Trimmomatic v0.33 软件, 对拼接得到的 Raw Tags 进行过滤, 得到高质量的 Tags 数据 (Clean Tags); (3) 去除嵌合体: 使用 UCHIME v4.2 软件, 鉴定并去除嵌合体序列, 得到最终有效数据 (Effective Tags)。

经过质量过滤, 去除嵌合体序列, 最终得到的序列用于 OTU 分析, 使用 VSEARCH (1.9.6) 进行序列聚类 (序列相似性设为 97%), 比对的参考数据库为 Silva 132。然后用 RDP classifier (Ribosomal Database Program) 贝叶斯算法对 OTU 的代表性序列进行物种分类学分析, 并在不同物种分类水平下统

计每个样本的群落组成。

基于 OTU 的分析结果,采用对样本序列进行随机抽样的方法,分别计算 Shannon、Chao1 等 α 多样性指数,并作出稀释曲线。通过 unweightedunifrac 分析比较样本间是否有显著的微生物群落差异,基于 Brary-Curtis 样本间距离矩阵用于 PCoA (principal co-ordinates analysis) 可视化图展示 β 多样性。通过层次聚类 (hierarchical cluatering) 中的非加权组平均法构建 UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) 进化树。

7 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。连续型变量采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。对分组样本的群落结构以及物种组成进行差异显著性检验,数据符合正态分布时,多组均数比较采用单因素方差分析;数据不符合正态分布时,组间数据分布比较采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 病例完成情况 (图 1) 电话筛查 2016 年 8 月—2017 年 6 月脾胃病科门诊的 UC 患者 150 例,经病情判断、患者自愿等前提下,纳入 36 例符合脾虚湿热型轻中度 UC 患者,有病情变化或要求电话联系,期间病情回访 1 次,患者组因未能坚持服药 4 周或拒绝治疗后回访等原因,最后完成整个试验的病例共 24 例,脱落 12 例。另选 15 名健康者为正常组。

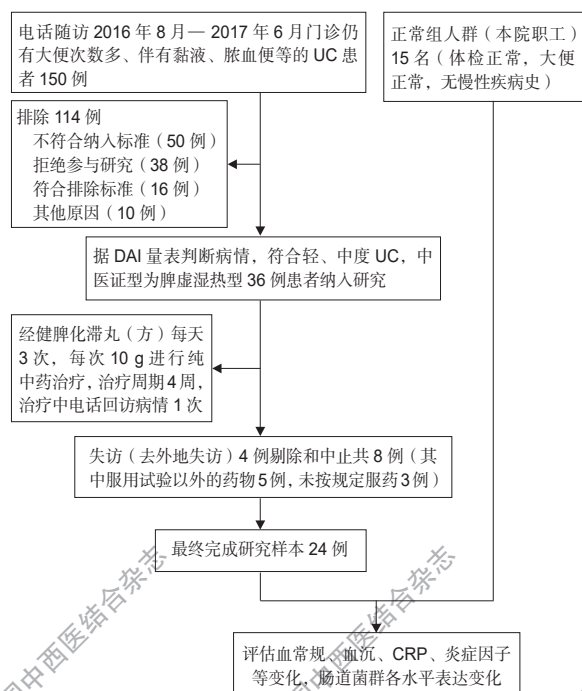


图 1 受试者流程图

2 正常组及患者治疗前后 WBC、CRP、ESR 比较 (表 1) 与正常组比较,患者治疗前 CRP、ESR 均有升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);与本组治疗前比较,患者治疗后 ESR 降低 ($P < 0.01$),其余指标均差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 正常组及患者治疗前后 WBC、CRP、ESR 比较 ($\bar{x} \pm s$)

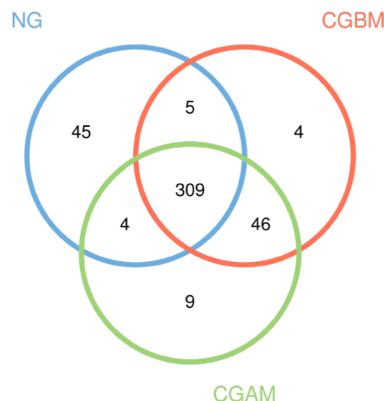
组别	例数	WBC ($10^9/L$)	CRP (mg/L)	ESR (mm/h)
正常	15	6.35 ± 1.37	1.00 ± 0.64	9.10 ± 3.72
患者治疗前	24	6.44 ± 2.27	$2.72 \pm 1.30^*$	$18.47 \pm 8.59^{**}$
患者治疗后	24	6.26 ± 2.07	2.58 ± 1.18	$11.33 \pm 4.84^\Delta$

注:与正常组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$;与本组治疗前比较, $^\Delta P < 0.01$

3 正常组及患者治疗前后血清中 TNF- α 、IL-10、IL-12、IL-23、TLR4 水平比较 (表 2) 与正常组比较,治疗前 TNF- α 、IL-12、IL-23 升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), IL-10 降低 ($P < 0.01$);与本组治疗前比较,治疗后 TNF- α 、IL-12、IL-23 明显下降 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), IL-10 升高 ($P < 0.05$), TLR4 治疗前后差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

4 患者治疗前后肠道粪便菌群变化

4.1 OTU 聚类 (图 2) 通过聚类得到各样品的 OTU。Venn 图显示了三组样本 OTU 的交集。显示了大多数 (309 个) OTU 为三组所共有,而三组分别有一些独有的 OTU。患者治疗前组独有的 OTU 为 OTU387、OTU361、OTU355、OTU328,而患者治疗后组独有的 OTU 为 OTU112、OTU239、OTU388、OTU389、OTU334、OTU422、OTU319、OTU403、OTU222。而在健康对照组中独有 45 种 OTU。



注: NG 为正常组; CGBM 为患者治疗前, CGAM 为患者治疗后; 图 2 同上

图 2 各组样本的 OTU VENN 图

4.2 科水平的丰度聚类 (图 3) 在科水平上,三组肠道菌群存在显著差异的有:普雷沃氏菌科 (Prevotellaceae), 巴斯德氏菌科 (Pasteurellaceae)、

表 2 正常组及患者治疗前后 TNF- α 、IL-10、IL-12、IL-23、TLR4 水平比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	IL-10	IL-12	IL-23	TNF- α	TLR-4
正常	15	13.50 $\pm$ 2.30	113.90 $\pm$ 38.11	93.21 $\pm$ 2.83	71.42 $\pm$ 14.94	3.62 $\pm$ 1.35
患者治疗前	24	8.60 $\pm$ 4.52**	178.50 $\pm$ 87.52*	102.63 $\pm$ 7.40**	106.14 $\pm$ 29.32**	3.76 $\pm$ 0.63
患者治疗后	24	12.10 $\pm$ 5.13 Δ	127.70 $\pm$ 66.71 $\Delta\Delta$	98.82 $\pm$ 4.96 Δ	84.36 $\pm$ 12.87 $\Delta\Delta$	3.71 $\pm$ 0.93

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与本组治疗前比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$

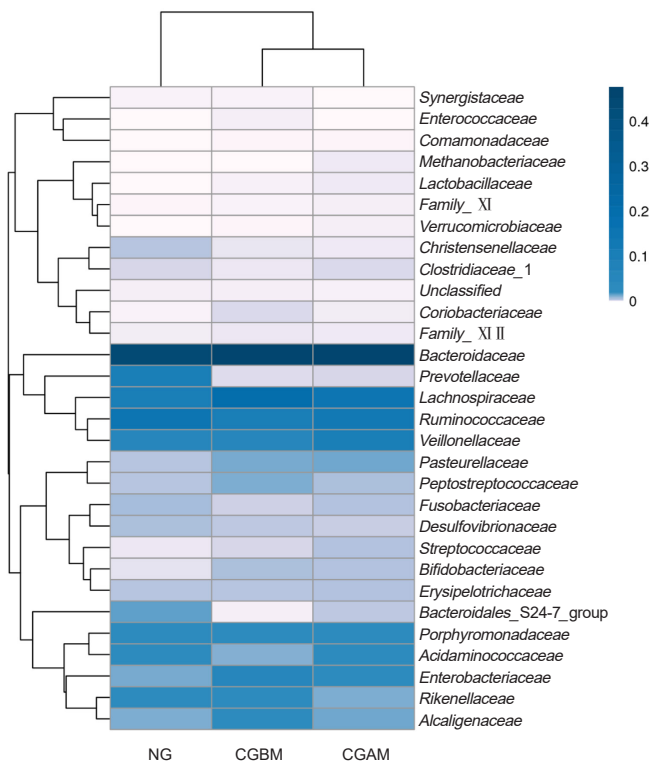


图 3 科水平的丰度聚类热图

肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*)、拟杆菌目 (*Bacteroidales*) 下的 *Bacteroidales_S24-7_group*、氨基酸球菌科 (*Acidaminococcaceae*)、消化链球菌科 (*Peptostreptococcaceae*)、产碱杆菌科 (*Alcaligenaceae*)。与正常组比较,治疗后患者巴斯德氏菌科、肠杆菌科、消化链球菌科、产碱杆菌科比例增高,普雷沃氏菌科、拟杆菌目下的 *S24-7* 科、氨基酸球菌科比例下降;与治疗前比较,治疗后患者巴斯德氏菌科、肠杆菌科、消化链球菌科、产碱杆菌科比例下降,普雷沃氏菌科、拟杆菌目下的 *S24-7* 科、氨基酸球菌科比例增高,其菌群组成结构、丰度趋近于正常组。

4.3 属水平的丰度聚类 (图 4) 在属水平上,三组肠道菌群存在显著差异的有:巨球形菌属 (*Megasphaera*)、*Parasutterella*、厌氧菌属 (*Anaerostipes*)、布劳特氏菌属 (*Blautia*)、毛螺菌属 (*Lachnospira*)、挑剔真杆菌属 (*[Eubacterium]_eligens_group*)、未分类属 (*unclassified*)、*Flavonifractor*、*Tyzzzerella_4*、巨细胞菌属 (*Megamonas*)、氨

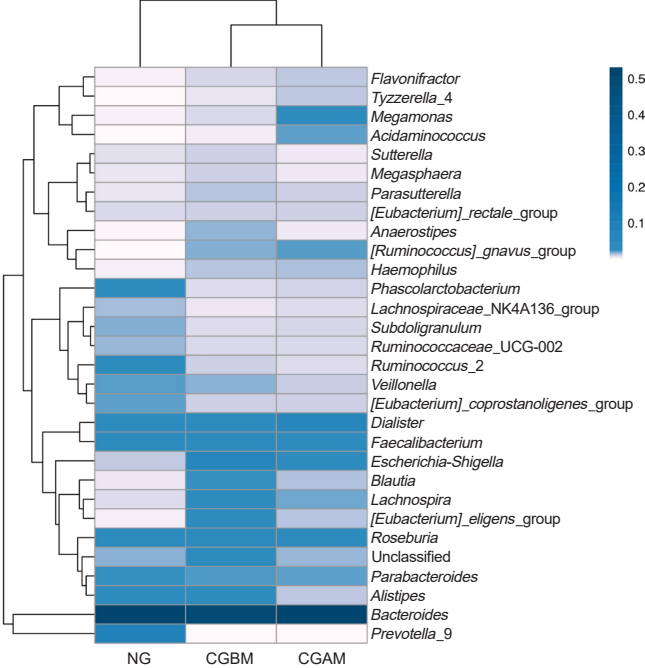


图 4 属水平的丰度聚类热图

基酸球菌属 (*Acidaminococcus*) 其中,治疗后与正常组比较,巨球形菌属、*Parasutterella*、厌氧菌属、布劳特氏菌属、毛螺菌属、挑剔真杆菌属、未分类属比例增高,而 *Flavonifractor*、*Tyzzzerella_4*、巨细胞菌属、氨基酸球菌属比例下降。与治疗前比较,患者治疗后巨球形菌属、*Parasutterella*、厌氧菌属、布劳特氏菌属、毛螺菌属、挑剔真杆菌属、未分类属比例下降,而 *Flavonifractor*、*Tyzzzerella_4*、巨细胞菌属、氨基酸球菌属比例上升,其菌群组成结构、丰度与正常组相似。

4.4 种水平的丰度聚类 (图 5) 在种水平上,三组肠道菌群存在显著差异的有脆弱拟杆菌 (*Bacteroides_fragilis*)、*g_Escherichia-Shigella_Unclassified*、厌氧菌属下的 *g_Anaerostipes_Unclassified*、巨球形菌属下的 *g_Megasphaera_Unclassified*、挑剔真杆菌属下的 *g_[Eubacterium]_eligens_group_Unclassified*、布劳特氏菌属下的 *g_Blautia_Unclassified*、毛螺菌属下的 *g_Lachnospira_Unclassified*、小杆菌属下的 *g_Dialister_Unclassified*、巨单胞菌属下的 *g_Megamonas_Unclassified*、氨基酸球菌属下的 *g_Acidaminococcus_Unclassified*。

*Acidaminococcus*_Unclassified。其中,患者治疗前与正常组比较, *Bacteroides_fragilis* (脆弱拟杆菌)、*g_Escherichia-Shigella*_Unclassified、厌氧菌属下的 *g_Anaerostipes*_Unclassified、巨球形菌属下的 *g_Megasphaera*_Unclassified、挑剔真杆菌属下的 *g_[Eubacterium]_eligens_group*_Unclassified、布劳特氏菌属下的 *g_Blautia*_Unclassified、毛螺菌属下的 *g_Lachnospira*_Unclassified 比例增高,而巨单胞菌属下的 *g_Megamonas*_Unclassified、氨基酸球菌属下的 *g_Acidaminococcus*_Unclassified、小杆菌属的 *g_Dialister*_Unclassified 比例下降。与治疗前比较,患者治疗后 *Bacteroides_fragilis*、*g_Escherichia-Shigella*_Unclassified、厌氧菌属下的 *g_Anaerostipes*_Unclassified、巨球形菌属下的 *g_Megasphaera*_Unclassified、挑剔真杆菌属下的 *g_[Eubacterium]_eligens_group*_Unclassified、布劳特氏菌属下的 *g_Blautia*_Unclassified、毛螺菌属下的 *g_Lachnospira*_Unclassified 比例下降,巨单胞菌属下的 *g_Megamonas*_Unclassified、氨基酸球菌属下的 *g_Acidaminococcus*_Unclassified、小杆菌属的 *g_Dialister*_Unclassified 比例上升,其菌群组成结构、丰度趋近于正常组。

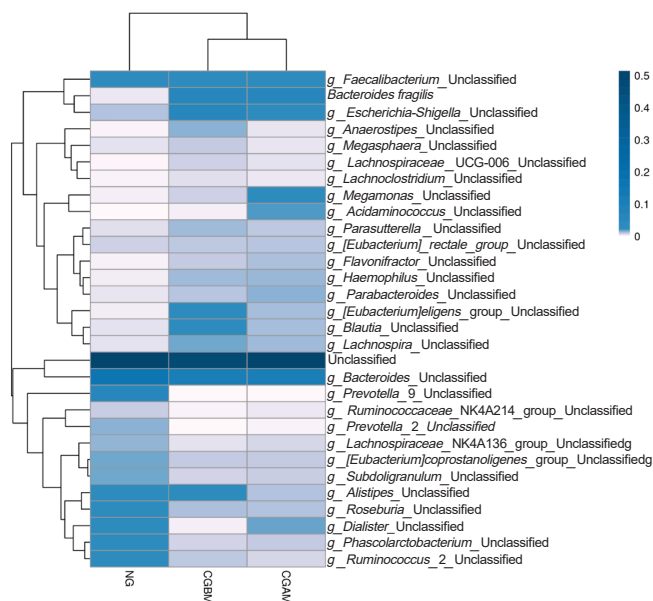


图5 种水平的丰度聚类热图

4.5 Alpha 多样性分析 (图6) Alpha 多样性 (Alpha diversity) 反映的是单个样品物种丰度 (richness) 及物种多样性 (diversity), Alpha 多样性指数组间比较发现 richness 在健康组与患病组之间存在显著差异。其他多样性指数在组间均差异无统计学意义。

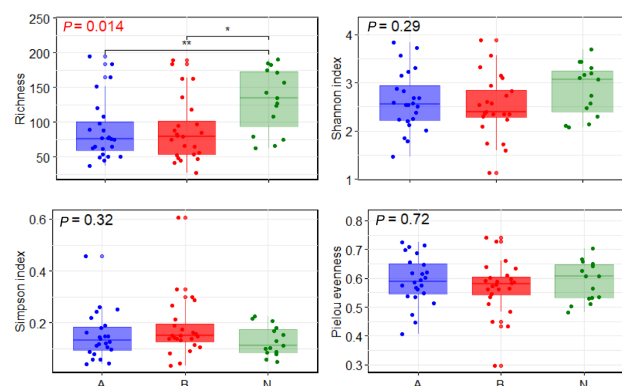


图6 Alpha 多样性指数组件比较

讨论

研究表明,中草药治疗 UC 具有临床远期疗效佳,个体化治疗优势明显,标本兼治,减少复发,多途径多靶点,且毒副作用小的特点,正越来越受到国内外专家的关注和认可,其疗效亦被临床和实验室所证实^[11-13]。

本研究基于研究团队前期临床实践,选择轻中度 UC 患者作为研究对象 (DAI 评分介于 3~8 分之间,血沉 <30 mm/h),疗程设定为 4 周,疗程设计主要参考依据:目前中成药及中药协定方的研究疗效观察时长多有不同,主要是有 2、4、8、12 周等,对于激素依赖性的患者往往中药临床研究观察时间较长,有 3 个月甚至 6 个月的用药时长,本研究纳入患者无激素依赖,且病情均为轻中度患者,故在疗程的设定上参考了健脾化滞丸前期的临床研究及其它研究者的观察时长选择了 4 周的观察时间^[14-17]。本研究选用纯中药治疗 (即单纯使用健脾化滞丸),未使用任何益生菌 (包括复合乳酸菌、地衣芽孢杆菌、双歧杆菌等) 及抗生素等影响肠道菌群表达的药物,且未联合使用激素、生物制剂等治疗。

通过长期临床治疗观察逐渐认识到 UC 虽病位在肠,但其发病之关键当责之于脾虚,并由此产生湿、热、瘀等致病因素,并发食积、气滞、痰湿、瘀血等病理产物,且湿、热、瘀、滞、虚贯穿疾病发生的始终,胶固难解。因此,湿热瘀结滞于肠道是其关键病机,脾气亏虚是 UC 发病的中心环节。所以,在治疗上提倡健脾清肠,化滞通络为主,据临床效果化裁调整为健脾化滞方 (肠安宁方优化方),该方由 12 味中药组成 (炒白术、黄连、槟榔、炒枳壳、厚朴、炮姜、煨木香、莪术、炒山楂、凤尾草、建曲、陈皮)。综观全方,在注重恢复脾的运化功能的同时辅以消食、化滞、通腑、活络,健脾又无肠腑壅塞之虑,共奏益气健脾、清肠化滞之效。同时有研究表明健脾化滞丸

可提高患者血清 IL-4 的水平、降低 TNF- α 水平,通过调控免疫反应最终达到治疗 UC 的目的^[8]。药理研究表明,健脾化滞丸的组成药物具有调节免疫、抗炎、改善血液循环、清除氧自由基等作用,其中白术^[18]等健脾益气药可增强机体免疫功能,加速细菌与毒素被吞噬的作用^[19],抑制炎性介质的分泌,可抑制变态反应;木香中木香烃内酯^[20]等对巨噬细胞 NO 的产生和 TNF- α 释放有明显的抑制作用,发挥抗炎作用;炒山楂、莪术、槟榔、枳壳等行气散瘀药可改善微循环,促进炎症吸收及黏膜组织修复再生,同时又可调节免疫功能。黄连提取物小檗碱可降低促炎因子,抑制细胞凋亡,对肠道菌群有调节作用,对维持肠道内微生物生态稳定及减轻机体炎症反应具有显著疗效。凤尾草水提物对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌等均有不同程度的抑菌效果。故健脾化滞方治疗 UC 的作用机制可能是通过改善局部微循环,调节肠道菌群及机体免疫功能实现的^[22]。

UC 患者肠道菌群多样性和丰度呈现特征性变化,本研究从科、属、种水平对 UC 患者治疗前后的菌群变化进行了解析表明,经健脾化滞方用药后患者在肠道菌群各水平层面有向健康组靠拢的趋势。相比于健康者,UC 患者肠道菌群的 Alpha 多样性减少,在科、属、种水平各级其菌群多样性均有下降,而功能性致病菌相对丰度升高,有益菌相对丰度下降。治疗后与治疗前比较,OTU 数量明显增多,在科、属、种水平上有益功能菌相对丰度升高,致病菌相对丰度降低,并趋近于健康者。可见,肠道菌群失调在 UC 的发生发展中具有重要作用,所呈现出的特定有益功能菌数量或丰度降低,潜在的促炎有害菌(主要包含某些兼性厌氧菌和革兰氏阴性菌)及其代谢物(游离花生四烯酸、脱氧胆酸等)^[23]数量或丰度升高。UC 发病是遗传易感宿主中环境、微生物、肠道屏障功能紊乱及免疫介导因素之间相互作用的结果。致病性菌群及其代谢物引起先天免疫应答,致免疫细胞产生大量细胞因子、趋化因子,破坏肠道内稳态,引发适应性免疫的激活,进一步产生细胞因子等递质,这种级联反应加剧了上皮细胞损伤,使肠道屏障功能受损,炎症加剧^[24]。

炎性细胞因子是在刺激反应中产生的小蛋白,主要由外周的免疫细胞合成,包括促炎细胞因子(IL-6、IL-8、IL-23 和 TNF- α 等)和抗炎细胞因子(IL-4 和 IL-10 等),肠道菌群可能通过调控炎性细胞因子的表达调节肠黏膜屏障的完整性,影响黏膜免疫功能,引起免疫性炎症。TNF- α 是作用极其广泛的常

见的促炎细胞因子,促进 IL-8、IL-23 等炎症因子的形成,增加肠上皮通透性,改变肠上皮细胞电解质和内环境,促使粒细胞浸润到炎症部位,诱导肠上皮细胞凋亡,导致肠黏膜微循环障碍,其在 UC 的炎症的瀑布级联反应中发挥着主导作用^[25-27]。有研究发现 TNF- α 在 UC 初始期即可出现,其表达水平与疾病的严重程度呈正相关^[25-27]。IL-10 是一种抗炎因子,能抑制巨噬细胞与中性粒细胞趋化性,避免其聚集于炎症部位,抑制炎症的发生,阻断多种炎性细胞的诱导合成^[28]。IL-12 是一种前炎症因子,其能促进 Th1 细胞的增殖和分化,为 Th1 反应提供了重要信号。IL-12 还可刺激 NK 细胞和 T 细胞诱导产生细胞因子 IFN- γ 等,扰乱 Th1/Th2 的动态平衡,促进炎症细胞浸润,导致组织损伤,其在细胞免疫中发挥重要作用^[29]。有研究表明,IL-23 在 UC 患者轻中重各期表达皆有明显升高,且随着病情的进展其表达逐渐升高,表明其与 UC 患者的炎症程度以及疾病发展有着密切的联系,二者呈正相关性^[30]。本研究发现 UC 患者血清中炎症因子 TNF- α 、IL-12、IL-23 表达较健康人群显著升高,抗炎因子 IL-10 显著降低,健脾化滞方用药组可明显调节肠道促炎因子及抗炎因子的表达,减轻肠道炎症,促进疾病向愈。且本研究发现健脾化滞方显著下调了患者 ESR 的计数,而 CRP 方面无显著作用。有研究表明 ESR 异常升高多提示肠黏膜受损、肠道屏障功能降低,与 UC 活动度和病情严重程度密切相关,故检测 ESR 水平有助于评估 UC 严重程度^[31]。

综上,UC 患者肠道菌群在科、属、种多层面存在差异,肠道菌群表现为有益菌减少,条件致病菌增多,且致病菌会产生一些可以诱导肠道炎症的物质,激活肠道黏膜免疫系统,分泌大量细胞因子,使肠道炎症加剧。经健脾化滞方治疗后菌群丰度、多样性明显增加,一方面,通过促进有益菌生长、抑制致病菌繁殖,从而达到宿主肠道菌群合理化,另一方面,健脾化滞方可明显调节肠道促炎因子及抗炎因子的表达,最终实现良好的临床疗效。

目前认为肠道菌群可能通过调节相关细胞因子及 T 淋巴细胞、阻断促炎性信号通路、促进抑炎因子的表达,抑制氧化应激、降低细胞凋亡反应来重建结肠黏膜屏障,恢复机体的肠道免疫应答,再者通过调节相关黏附分子,从而抑制炎性细胞的浸润,减轻肠黏膜组织的损伤^[32],这为健脾化滞丸治疗 UC 机制的进一步探索提供了方向。

利益冲突: 本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, et al. Ulcerative colitis[J]. Lancet, 2017, 389 (10080): 1756–1770.
- [2] Zhao J, Ng SC, Lei Y, et al. First prospective, population-based inflammatory bowel disease incidence study in mainland of China: the emergence of "western" disease[J]. Inflamm Bowel Dis, 2013, 19 (9): 1839–1845.
- [3] 沈洪, 邢敬, 朱磊, 等. 炎症性肠病中西医结合治疗策略的探索与实践[J]. 北京中医药, 2020, 39 (3): 191–195.
- [4] 王亮, 张亚利, 葛婷, 等. 溃疡性结肠炎的中医药治疗[J]. 吉林中医药, 2012, 32 (5): 466–468.
- [5] 苏晓兰, 国嵩, 张涛, 等. 炎症性肠病诊治现状及中医药治疗特色与优势[J]. 北京中医药, 2020, 39 (3): 211–215.
- [6] 陈亮, 景珊, 孙蓓, 等. 健脾化痰解毒中药复方对溃疡性结肠炎患者血清细胞因子 EGF、TGF- β 1 及 TNF- α 的影响[J]. 天津中医药大学学报, 2017, 36 (5): 352–355.
- [7] 陈亮, 景珊, 孙蓓, 等. 健脾化痰解毒复方对溃疡性结肠炎患者炎症因子及免疫屏障影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20 (2): 98–101.
- [8] 王钦, 顾庆华. 健脾化滞丸治疗溃疡性结肠炎 (脾虚湿热证) 30 例[J]. 中国中医急症, 2011, 20 (1): 157–158.
- [9] 中华医学会消化病学分会炎症性肠病学组. 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见 (2012 年, 广州)[J]. 中华消化杂志, 2012, 32 (12): 796–813.
- [10] 中华中医药学会脾胃病分会. 溃疡性结肠炎中医诊疗共识意见[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25 (6): 891–895.
- [11] 谢晶日, 孙涛, 张冰. 溃疡性结肠炎的中医药治疗进展及相关优势探讨[J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43 (2): 425–427.
- [12] Wang C, Tang X, Zhang L. HuangqinTang and ingredients in modulating the pathogenesis of ulcerative colitis[J]. Evid-Based Compl Alt, 2017, 2017: 7016468.
- [13] Zheng L, Zhang YL, Dai YC, et al. Jianpi Qingchang decoction alleviates ulcerative colitis by inhibiting nuclear factor- κ B activation[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23 (7): 1180–1188.
- [14] 周广泉. 健脾化滞丸治疗脾虚湿热型溃疡性结肠炎临床疗效观察[D]. 咸阳: 陕西中医药大学, 2014.
- [15] 沈舟, 叶柏. 葛根芩连汤合白头翁汤治疗溃疡性结肠炎临床疗效观察[J]. 中药药理与临床, 2015, 31 (1): 351.
- [16] 蓝寿煌, 刘梓平, 杨克详, 等. 菖蒲清肠汤治疗溃疡性结肠炎临床观察[J]. 新中医, 2015, 47 (7): 71–73.
- [17] 郑培奋, 李希诗, 朱琴, 等. 连理汤加味对活动期溃疡性结肠炎 IL-23 表达的影响和临床疗效[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32 (10): 2472–2474.
- [18] 杨颖, 魏梦昕, 伍耀业. 白术多糖提取分离、化学组成和药理作用的研究进展[J]. 中草药, 2021, 52 (2): 578–584.
- [19] 潘炜, 于玲, 甘淳. 健脾温肾法治疗溃疡性结肠炎[J]. 新中医, 2019, 51 (12): 325–326.
- [20] 王阳, 范潇晓, 杨军. 木香的萜类成分与药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45 (24): 5917–5928.
- [21] 陶柱萍, 龙宇, 李灿委. 肠道菌群在中草药抗溃疡性结肠炎中的作用[J]. 药学报, 2021, 56 (2): 391–402.
- [22] 高燕萍, 吴强, 张亚梅. 凤尾草化学成分及药理活性研究进展[J]. 安徽农业科学, 2017, 45 (29): 126–130.
- [23] 唐英觉, 党延启. 肠道菌群及其代谢物与溃疡性结肠炎的关系[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2021, 29 (3): 226–230.
- [24] Neurath MF. Targeting immune cell circuits and trafficking in inflammatory bowel disease[J]. Nat Immunol, 2019, 20 (8): 970–979.
- [25] 张冰, 谢晶日, 孙涛. 肠愈宁对溃疡性结肠炎模型大鼠结肠黏膜损伤修复的作用研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2020, 28 (6): 427–432.
- [26] Pugliese D, Felice C, Papa A, et al. Anti TNF- α therapy for ulcerative colitis: current status and prospects for the future[J]. Expert Rev Clin Immunol, 2017, 13 (3): 223–233.
- [27] 邵启蕙, 郭颂铭, 董秋安. 自拟“溃结 2 号方”治疗溃疡性结肠炎的临床观察[J]. 同济大学学报, 2020, 41 (1): 112–116.
- [28] 安桂叶, 谢卜超, 王亚敏, 等. 翁连解毒汤对浊毒内蕴型溃疡性结肠炎患者炎症因子影响[J]. 时珍国医国药, 2020, 31 (3): 650–652.
- [29] 王碧玉, 刘富林, 胡政, 等. 痛泻要方对溃疡性结肠炎模型大鼠血清 IL-12 含量及 NPY 水平影响的研究[J]. 湖南中医杂志, 2016, 32 (4): 166–167.
- [30] 常旭. 血清 IL-23 和 IL-17 水平变化在溃疡性结肠炎临床诊断中的应用价值[J]. 中国现代药物应用, 2017, 11 (2): 68–70.
- [31] 王金乐, 陈娟, 张蓉, 等. FCP、MPO、ESR、CRP 评价溃疡性结肠炎活动度的应用价值分析[J]. 结直肠肛门外科, 2019, 25 (3): 311–314.
- [32] 王一帆, 王凤云, 张佳琪, 等. 中医药调节肠道菌群防治溃疡性结肠炎的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39 (9): 160–164.

(收稿: 2021-04-25 在线: 2023-06-07)

责任编辑: 白霞