

李婷,邹秋萍,毛泽伟,等. 三点金中黄酮类化合物对溃疡性结肠炎小鼠的干预作用及其对肠道菌群的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 29-38.

Li T, Zou QP, Mao ZW, et al. Therapeutic effect of flavonoids from *Desmodium triflorum* on an ulcerative colitis mouse model and the influence on intestinal flora [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 29-38.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 04. 005

三点金中黄酮类化合物对溃疡性结肠炎小鼠的干预作用及其对肠道菌群的影响

李 婷, 邹秋萍, 毛泽伟, 吴石丽, 何红平, 李艳平*

(云南中医药大学中药学院, 昆明 650500)

【摘要】 目的 探讨民族药三点金总黄酮及其中单体化合物毛蕊异黄酮和刺芒柄花素对右旋葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的溃疡性结肠炎(UC)小鼠的干预作用及其对肠道菌群的影响。**方法** 用3% DSS构建UC小鼠模型,将30只C57BL/6小鼠分为正常组、模型组、三点金总黄酮组(500 mg/kg)、毛蕊异黄酮组(100 mg/kg)以及刺芒柄花素组(100 mg/kg)。观察小鼠体重变化,进行疾病活动指数(DAI)、结肠组织病理学评分,检测小鼠血清中IL-1 β 和IL-6含量,通过高通量测序分析小鼠肠道菌群的变化。**结果** 三点金总黄酮、毛蕊异黄酮以及刺芒柄花素可有效减轻小鼠结肠炎症状,降低炎症因子表达;菌群测序结果显示三点金总黄酮、毛蕊异黄酮以及刺芒柄花素使得肠道菌群的多样性明显提高,科水平上主要表现为致病菌群螺杆菌科比例降低,*Muribaculaceae*和毛螺菌科比例升高;属水平上主要表现为乳酸菌属的增加和条件致病菌拟杆菌的减少;种水平上主要表现为对机会致病菌拟杆菌和大肠杆菌的减少。**结论** 三点金总黄酮、毛蕊异黄酮以及刺芒柄花素对UC小鼠的体征及炎症因子有一定的改善作用,对肠道菌群有良好的恢复作用。

【关键词】 三点金;总黄酮;毛蕊异黄酮;刺芒柄花素;溃疡性结肠炎;肠道菌群

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 04-0029-10

Therapeutic effect of flavonoids from *Desmodium triflorum* on an ulcerative colitis mouse model and the influence on intestinal flora

LI Ting, ZOU Qiuping, MAO Zewei, WU Shili, HE Hongping, LI Yanping*

(Yunnan University of Chinese Medicine, College of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

【Abstract】 Objective The purpose of this study was to investigate the effect of total flavones of *Desmodium triflorum*, calycosin and formononetin from *D. triflorum* on mice with dextran sodium sulfate (DSS)-induced ulcerative colitis (UC) and analyze the effects on intestinal flora. **Methods** Thirty C57BL/6 mice were treated with 3% DSS to establish the UC model and divided into the normal group, model group, total flavones of *Desmodium triflorum* group (500 mg/kg), calycosin group (100 mg/kg) and formononetin group (100 mg/kg). Body weight changes, disease activity index (DAI), colon histopathology score and IL-1 β and IL-6 cytokine expression levels in the serum of the mice were

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81960777,81660717);云南省应用基础研究项目(2019FF002(-005),2017FB133);云南省教育厅项目(2019Y0332)。

【作者简介】 李婷(1996—),女,硕士研究生,研究方向:天然药物化学成分及生物活性研究。E-mail:1457044166@qq.com

【通信作者】 李艳平(1986—),女,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:中药,天然药物化学成分及生物活性研究。

E-mail:lyp8691@163.com

determined, and changes of intestinal flora in mice were detected by high-throughput sequencing. **Results** Administration of total flavones of *D. triflorum*, calycosin and formononetin from *D. triflorum* effectively alleviated colonic inflammatory symptoms and reduced the expression of inflammatory factors in UC mice, Resulting in a good therapeutic effect. Treatment with total flavones of *D. triflorum*, calycosin and formononetin from *D. triflorum* significantly increased the diversity of intestinal microflora. The proportion of *Helicobacteraceae* was decreased and those of *Muribaculaceae* and *Lachnospiraceae* were increased at the family level. The proportion of *Bacteroides* was decreased and that of *Lactobacillus* was increased at the genus level. Regarding the species level, the proportions of *Bacteroides* and *Escherichia coli* were decreased. **Conclusions** Total flavones of *D. triflorum*, calycosin and formononetin from *D. triflorum* improve the changes of physical signs and inflammatory factors of UC mice and had a good recovery effect on intestinal flora.

[Keywords] *Desmodium triflorum*; total flavonoids; calycosin; formononetin; ulcerative colitis; intestinal flora

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种发生在直肠和结肠黏膜的慢性炎症性疾病, 病因未明, 反复发作是其典型特征, 对患者的生活造成极大的困扰, 被 WHO 列为难治症之一, 近年来 UC 的发病率呈显著上升趋势^[1-3]。UC 发病机制复杂, 涉及患者的遗传、免疫系统和环境因素之间的相互作用^[4]。其中, 慢性炎症反应和免疫应答紊乱是造成 UC 的关键病理环节, 而肠道内菌群紊乱又是造成炎症反应和免疫应答改变的重要因素^[5]。近年来, 越来越多的研究表明肠道菌群失调与 UC 的发生密切相关^[6-7], 主要表现为患者局部微脉管系统损伤, 产生趋化因子, 引起白细胞游出, 从而扩大炎症反应, 这使得上皮屏障破坏, 肠道中有害菌产物进入血液系统导致发病^[8]。

三点金 (*Desmodium triflorum* (L.) DC.) 为豆科山蚂蝗属多年生植物, 又名斑鸠窝, 遍地金钱, 在少数民族医学著作中记载它的全草可以用来治疗各种炎症包括急性肠炎、大叶性肺炎、感冒发烧、咳嗽和肝炎^[9]。本课题组前期的研究从云南省昆明市嵩明县的豆科山蚂蝗属植物三点金中分离纯化得到 12 个化合物, 包括牡荆素、异牡荆素、刺芒柄花素、毛蕊异黄酮等一系列黄酮及其苷类化合物。这些黄酮类化合物在抗炎方面表现出显著的作用。如 Yang 等^[10]发现刺芒柄花素是通过上调 Nrf2 的表达而起到抑制溃疡性结肠炎的作用。Chao 等^[11]发现毛蕊异黄酮可通过抑制 NF- κ B 通路和 JNK 通路活化抑制小鼠巨噬细胞炎症因子的产生。上述研究表明刺芒柄花素和毛蕊异黄酮可能对 UC 也有一定的治疗作用。因此, 本研究探讨了是否是通过三点金总黄酮及其两个单体化合物的干预起到了对 UC 小鼠的改善作用及肠道菌群失衡的调节作用, 为民族药三点金总黄酮及其两个单体化合物作为 UC 治疗药物提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司 (30 只, 6 周龄, 体重 18~20 g) [SCXK(湘)2019-0004]。在 SPF 级动物房饲养, 昼夜节律 12 h/12 h, 实验前适应性饲养 1 周。动物饲养使用标准鼠饲料和水, 饲养于云南中医药大学动物房 [SYXK(滇)K2017-0005]。所有动物实验均经云南中医药大学动物实验伦理委员会审查通过 (IACUC-06202006) 并遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

刺芒柄花素 (南京源植生物科技有限公司, 批号: 20180801); 毛蕊异黄酮 (南京源植生物科技有限公司, 批号: 20170926), 纯度均大于 95%; DSS (美国 MP 公司, 批号 SR01606); IL-1 β , IL-6 ELISA 试剂盒 (杭州联科生物技术股份有限公司, 批号 A201B90612 和 A20600643); DNA 提取试剂盒 (美国 Omega Bio-Tek 公司); GeneJET 胶回收试剂盒 (美国 Thermo Scientific 公司); Phusion[®] High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer (美国 New England Biolabs 公司)。分析天平 AR224CN (常州奥豪斯仪器有限公司); 超低温冰箱 (美国 Thermo Scientific 公司); 酶标仪 SPARK 10M (瑞士 TECAN 公司); Ion S5TMXL (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组

将动物随机分为正常组 (N1)、模型组 (M1)、三点金总黄酮组 (TF1) (500 mg/kg)、毛蕊异黄酮组 (F1) (100 mg/kg) 和刺芒柄花素组 (F2) (100 mg/kg), 每组 6 只。

1.3.2 三点金总黄酮的制备

在课题组前期工作的基础, 将民族药用植物三

点金的地上部分(1 kg)干燥后粉碎,用 70%丙酮在室温下超声提取,提取液减压浓缩得到总浸膏。所得浸膏用蒸馏水混悬,用石油醚萃取除去叶绿素,水相经乙酸乙酯萃取,萃取物浓缩后经大孔吸附树脂柱,依此用水,90%,100%甲醇-水进行洗脱,90%甲醇-水洗脱部分减压浓缩,经三氯化铁反应鉴定 90%甲醇-水洗脱部分富含黄酮类成分,即为三点金总黄酮。

1.3.3 造模方法及药物干预

参照参考文献^[12]的造模方法及通过预实验实践后,将小鼠适应性饲养 1 周,正常组和模型组灌胃给予 0.5%羧甲基纤维素钠溶液、3 个给药组 TF1、F1 及 F2 组灌胃给予相应浓度的药物,连续给药 11 d,从第 1 天开始,除正常组外,其余各组小鼠的饮用水更换为 3% DSS 水溶液连续 8 d,第 9 天将 3% DSS 水溶液更换为饮用水至实验结束。

1.3.4 检测指标与方法

(1)UC 小鼠的观察与评分

参照参考文献^[13]中的方法,在实验期间,每天观察小鼠的体征状态并记录体重。通过小鼠的腹

泻及便血情况得出小鼠 DAI 评分,判断溃疡性结肠炎模型是否构建成功。DAI 评分=(体重下降分数+大便性状分数+便血分数)/3。DAI 的具体评分标准如表 1。

(2)结肠病理切片观察肠黏膜损伤程度

造模结束后,颈椎脱臼法处死小鼠,立即解剖,取小鼠结肠中段约 1 cm 左右,于 4%多聚甲醛中浸泡 48 h 固定,脱水,石蜡包埋,制片(4 μm 厚),HE 染色。参照参考文献^[14]中的方法进行组织病理学评分,如表 2 所示。

(3)动物取血及血清处理

实验结束当天,取眼眶血,3000 r/min,4℃离心 10 min,收集上清。于-80℃冰箱储存备用。按 ELISA 试剂盒说明书测定各组血清中 IL-1β、IL-6 含量。

1.3.5 小鼠粪便样本采集

在实验结束前 1 d,确认模型成功后,用左手抓取小鼠,促使小鼠应激性排便,右手持无菌 EP 管保证相对无菌环境下收集小鼠粪便。粪便收集结束后标记样本,置于冰盒中,及时放入-80℃冰箱保存备用,避免反复冻融。

表 1 DAI 评分标准
Table 1 Score criteria of DAI

计分 Score	体重下降(%) Loss of weight	大便性状 Stool characteristics	便血 Hematochezia
0	/	正常 Normal	阴性(-) Negative(-)
1	1~5	松散但不黏肛周 Loose but not sticky around the anus	阳性(±) Positive(±)
2	5~10	松散但不黏肛周 Loose but not sticky around the anus	阳性(+) Positive(+)
3	10~15	松散黏肛周 Loose and sticky around the anus	阳性(++) Positive(++)
4	>15	腹泻 Diarrhea	肉眼血便(>++) Bloody stool(>++)

表 2 病理切片评分
Table 2 Score of pathological section

评分 Score	炎症程度 Degree of inflammation	隐窝损伤 Crypt injury	炎症深度 Depth of inflammation	炎症浸润面积 Inflammatory infiltration area
0	无 Nothing	无 Nothing	无炎症 Without inflammation	0
1	浅显炎症 Superficial inflammation	少量隐窝变形 A small amount of crypt deformation	黏膜层 Mucosal layer	0~10%低水平(含1%) 0~10% low level (including 1%)
2	轻微溃疡 Slight ulcer	中等水平隐窝变形 Moderate horizontal recess deformation	黏膜下层 Submucosa	11%~25%中等水平(不含1%) 11%~25% medium level (excluding 1%)
3	明显溃疡 Obvious ulcer	高水平隐窝变形 High level recess deformation	肌层 Muscularis	26%~50%高水平 26%~50% high level
4	/	明显隐窝缺失 Obvious absence of crypt	/	51%~100%

1.3.6 粪便 DNA 提取和 PCR 扩增纯化

用 DNA 提取试剂盒提取粪便中的总 DNA 并检测其提取质量。以带有 barcode 序列的 515F 和 806R 为引物,以细菌 16S rRNA 基因的 V4 可变区序列为靶标进行 PCR 扩增,使用 1×TAE 浓度 2% 的琼脂糖胶电泳纯化 PCR 产物,剪切回收目标条带,使用 GeneJET 胶回收试剂盒回收产物。

1.3.7 文库构建和上机测序

使用 Ion Plus Fragment Library Kit 48 rxns 试剂盒进行文库的构建,经 Qubit 定量和文库检测合格后,使用 Ion S5TMXL 进行上机测序。测序分析内容包括:测序数据处理、OTU 聚类 and 物种注释、样品复杂度分析、多样品比较分析及评估样品中细菌菌群的丰富度和均匀度。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件处理数据。结果用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用单因素方差分析方法 (ANOVA) 分析,以 $P < 0.05$ 表示统计学差异。使用 Graphpad Prism7 软件制图。

2 结果

2.1 一般体征及 DAI 评分结果

正常组小鼠精神状态,毛发色泽,进食及大便秘性状均正常;模型组小鼠造模后第 3 天,开始出现体重下降,精神萎靡,稀便并夹带脓血,第 5 天体重明显下降,便血严重;TF1、F1 及 F2 组在给药后,虽然也有稀便,便血情况,体重也呈下降趋势,但相比于模型组,均有不同程度的改善(图 1A)。

从实验开始至结束,每天固定时间观察小鼠粪便以进行 DAI 评分。TF1、F1 及 F2 组的小鼠在给药后的第 5 天,稀便,血便情况有所改善,第 8 天出现活动增加,食量增加,其毛发、腹泻、大便秘性状等情况均有所改善,DAI 评分显著降低(图 1B)。

2.2 HE 染色及病理组织学评分

正常组小鼠上皮组织完整,可见明显的隐窝及杯状细胞,无炎症细胞侵入。模型组小鼠上皮组织损伤严重,隐窝变形,杯状细胞丢失,黏膜及黏膜下层有炎症细胞浸润。而三点金总黄酮组、毛蕊异黄酮组及刺芒柄花素组组织学炎症程度减轻,结肠隐窝结构变形不明显。病理组织学评分显示,与模型组相比,三点金总黄酮组和毛蕊异黄酮组评分显著降低($P < 0.01$)且改善效果优于刺芒柄花素组($P < 0.05$)(见图 2A、2B)。

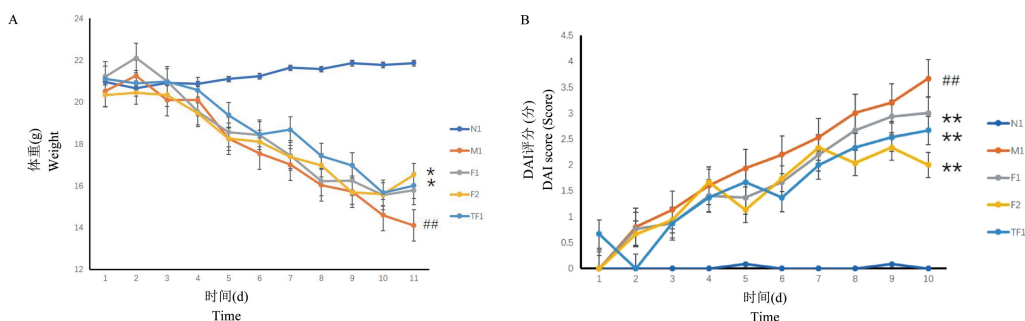
2.3 血清炎症因子检测结果

模型组小鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 水平相较于正常组显著升高($P < 0.01$),给药组 IL-1 β 、IL-6 的水平有不同程度的降低,且毛蕊异黄酮组的效果优于三点金总黄酮组和刺芒柄花素组(见图 3)。

2.4 小鼠肠道菌群测序结果

2.4.1 测序样本质量检测

由图 4A 可见小鼠粪便中 OTU 数随测序量不断增加,最后趋于平稳,达到饱和状态,表明样品测序质量符合要求。等级丰度曲线能够反映物种的丰富度和均匀度。结果表明,5 组样品的曲线最后都趋于平稳,表明物种分布均匀(图 4B)。其中正常组的等级丰度在 400~580 之间,经 DSS 诱导后,各



注: N1: 正常组; M1: 模型组; F1: 毛蕊异黄酮组; F2: 刺芒柄花素组; TF1: 三点金总黄酮组。与正常组比较, $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。

图 1 各组小鼠体重变化和 DAI 评分的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Notes. N1, Control group. M1, Model group. F1, Calycosin group. F2, Formononetin group. TF1, Total flavones of *Desmodium triflorum* group. Compared with control group, $^{##}P < 0.01$. Compared with model group, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$.

Figure 1 Effect of weight change and DAI score in each group

组小鼠肠道菌群的物种总数降低,模型组的等级丰度在 350~450 左右,经给药治疗后,TF1 组的等级丰度在 500~750 之间,表明其肠道菌群的多样性明显提高;F1 组的等级丰度在 400~550 之间,其微生物种群丰度趋向正常组,然而单体 F2 组的等级丰度在 300~400 之间,并未有显著提高,且略低于模型组。

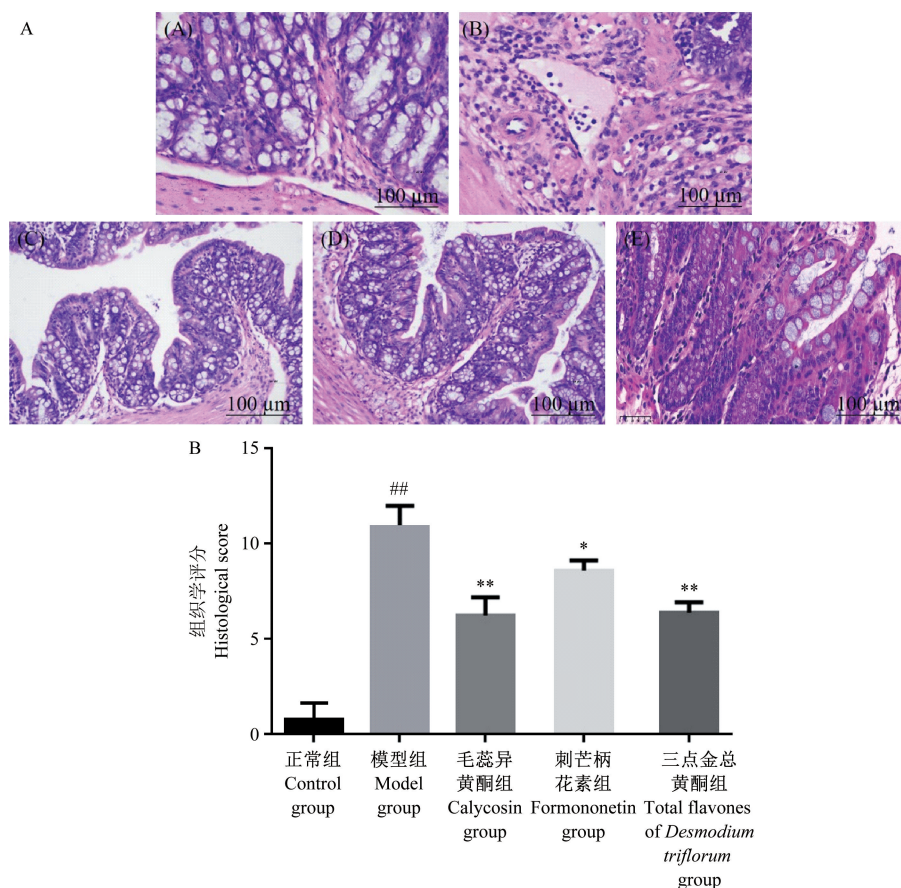
2.4.2 小鼠肠道菌群多样性分析

Observed species 和 Shannon 指数是评价结肠菌群多样性的重要指数,其数值越高表明样品物种丰富度越高。由图 5A 可见,相比于模型组,F1、F2 组观察到的物种差异显著,表明毛蕊异黄酮和刺芒柄花素显著改变了小鼠的肠道微生物的多样性。由图 5B 可见,相比于正常组,模型组肠道菌群多样性降低。相较于模型组,TF1 组肠道菌群多样性明显

升高,且恢复到正常组水平;F1 组呈略微升高的状态,但是 F2 组对于肠道菌群多样性没有起到改善作用,表明三点金总黄酮对于肠道菌群多样性的改善作用优于其两个单体化合物。

2.4.3 小鼠肠道菌群的整体变化

韦恩图分析可提供各组间菌群 OTU 数量及其种类交叉情况,主成分分析(PCA)检测样本间菌群丰度整体差异。结果表明,正常组、模型组、F1、F2 以及 TF1 组共有的 OTU 数为 453 个(图 6A)。与模型组相比,F1 处理组显著性增加了 OTU 数量但仍然略低正常组;F2 组减少了 OTU 数量;TF1 组显著性增加 OTU 的数量且比正常组的更为丰富。由 PCA 结果表明,各组间样本均能明显区分,说明小鼠肠道菌群的结构产生了一定的变化。给药组肠道菌群结构与模型组相比发生了一定偏移,值得注

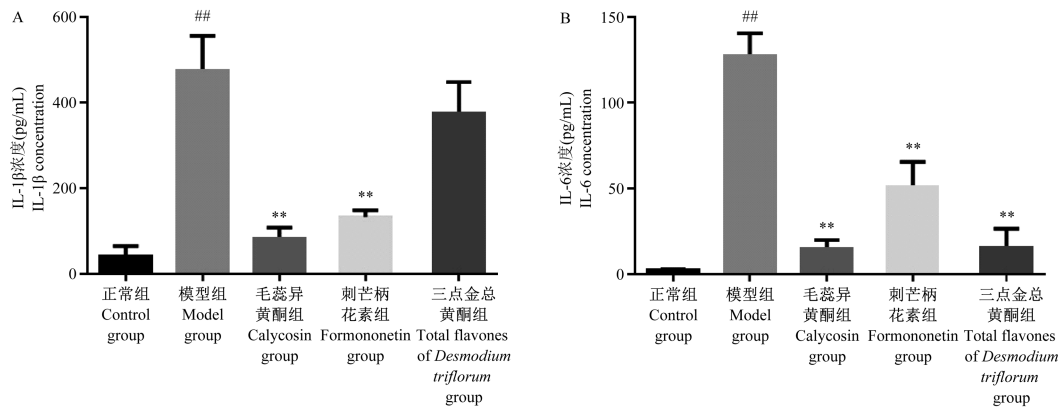


注:(A):正常组;(B):模型组;(C):毛蕊异黄酮组;(D):刺芒柄花素组;(E):三点金总黄酮组。与正常组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图2 各组小鼠结肠 HE 染色及评分结果(HE 染色)($\bar{x} \pm s, n=6$)

Notes. (A), Control group. (B), Model group. (C), Calycosin group. (D), Formononetin group. (E), Total flavones of *Desmodium triflorum* group. Compared with control group, ## $P<0.01$. Compared with model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 2 Colon HE staining and scoring results of mice in each group(HE staining)

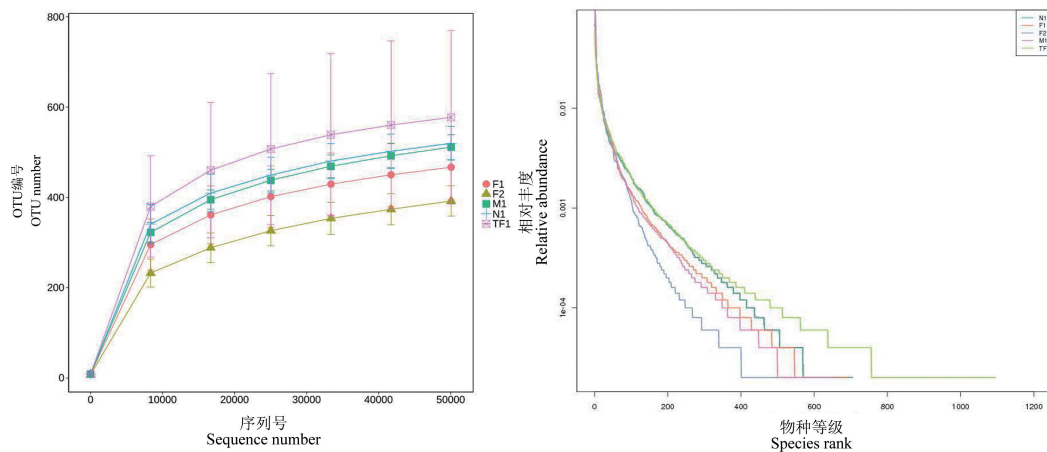


注:与正常组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.01$ 。

图3 各组小鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 水平比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

Notes. Compared with control group,## $P<0.01$. Compared with model group, ** $P<0.01$.

Figure 3 Comparison of IL-1 β and IL-6 levels in serum of mice in each group



注:N1:正常组;M1:模型组;F1:毛蕊异黄酮组;F2:刺芒柄花素组;TF1:三点金总黄酮组。

图4 样品稀释曲线和丰度分布曲线

Notes. N1, Control group. M1, Model group. F1, Calycosin group. F2, Formononetin group. TF1, Total flavones of *Desmodium triflorum* group.

Figure 4 Sample dilution curve and rank abundance curve

意的是 F1 和 TF1 组有向正常组回归的趋势,然而刺芒柄花素并没有这个趋势(图 6B)。说明毛蕊异黄酮和三点金总黄酮能一定程度上促进肠道菌群多样性及结构的恢复,而刺芒柄花素对于肠道菌群多样性及结构没有起到恢复的作用,则可能主要是通过降低致病菌的数量而起到治疗 UC 的作用。

2.4.4 小鼠肠道菌群物种差异分析

在科水平上,*Muribaculaceae* 和毛螺菌科(*Lachnospiraceae*)是正常组的优势菌株,其相对丰度分别为 28.52% 和 19.35%;模型组中拟杆菌科(*Bacteroidaceae*),韦荣球菌科(*Erysipelotrichaceae*),瘤胃球菌科(*Ruminococcaceae*)以及毛螺菌科优势菌株,相对丰度分别为 22.84%,16.39%,11.48%和

10.74%。与正常组相比,模型组中 *Muribaculaceae* (7.66%) 和毛螺菌科(10.74%)的相对丰度显著的降低,而条件致病菌拟杆菌科的丰度(22.84%)比正常组(2.26%)极大地升高。F1 组中杆菌科(*Enterobacteriaceae*),拟杆菌科以及毛螺菌科则为主要的优势菌株,其相对丰度分别为 23.54%,18.80%,以及 12.46%,其中毛螺菌科的相对丰度较模型组非常接近,但致病菌群螺杆菌科(*Helicobacteraceae*)的相对丰度(0.78%)相较于正常组(2.49%)和模型组(2.09%)发生了显著性地降低。F2 组杆菌科和拟杆菌科为其优势菌群,相对丰度分别为 43.50%和 13.53%,其中拟杆菌科的丰度与 F1 处理组较为接近,且致病菌群螺杆菌科的相

对丰度(0.43%)相较于 F1 组进一步的降低。TF1 组中 *Muribaculaceae*, 毛螺菌科以及拟杆菌科为其优势菌群, 相对丰度分别为 13.81%, 20.18% 以及 11.12%, 与以上各组相比, *Muribaculaceae* 和毛螺菌科再次成为优势菌群(与正常组一致), 这表明总黄酮对于结肠炎小鼠肠道微生物的调节和恢复有较好的作用(见图 7A)。

属水平上, 有益菌乳酸菌属(*Lactobacillus*)为正常组优势菌群, 相对丰度为 15.55%, 而模型组该属则降低为 1.97%, 取而代之的条件致病菌拟杆菌(*Bacteroides*)的丰度则极为提升, 为 22.84%, 说明在结肠炎模型组中, 有益菌极大的减少, 机会致病菌大量增殖。通过 F1、F2、TF1 处理后, 条件致病菌拟杆菌虽然仍然为 3 个组中的优势菌群, 但是其相对丰度(18.80, 13.52, 11.12)相比模型组均有显著性地降低, 同时 F1 与 TF1 处理组中, 乳酸菌属的相对丰度也比模型组(1.97%)分别提升了约 2~3 倍(4.06%和 6.28%)(见图 7B)。

进一步对种水平上对机会致病菌拟杆菌和大肠杆菌的分析发现 F1、F2 以及 TF1 处理组可以显著降低其丰度(见图 8)。

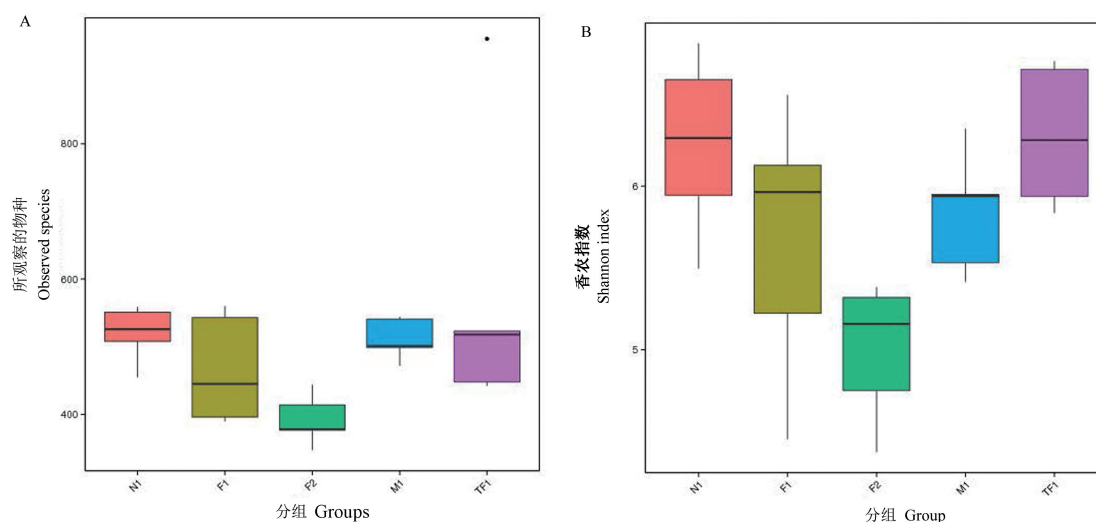
2.4.5 LefSe 分析

LefSe 分析可结合非参数检验和线性判别来确定丰度较高的微生物。由图 9 可看出, 正常组显著最高的是 *Muribaculaceae* 科和厚壁菌门(*Firmicutes*), 模型组是拟杆菌科和拟杆菌属, F1 处

理组显著最高的是肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*), F2 处理组显著最高的是变形菌门(*Proteobacteria*)、变形菌(*Gammaproteobacteria*)、肠杆菌科和肠杆菌目(*Enterobacterales*); TF1 处理组显著最高的是梭菌纲(*Clostridia*)和梭菌目(*Clostridiales*)。结果表明, 经三点金总黄酮、毛蕊异黄酮和刺芒柄花素可能是通过改变菌群的结构组成而发挥作用。

3 讨论

近年来, 随着膳食结构和环境的变化, UC 发病率在全球呈现逐年上升趋势, 以欧洲和北美最高, 严重影响了患者的生活质量^[15]。临床上, 虽然 5-氨基水杨酸和皮质类固醇等药物可抑制炎症, 一些免疫调节剂和抗生素可用于治疗类固醇耐药或依赖的患者, 但价格昂贵及治疗后的继发感染、敏感性降低和副作用大等安全性问题使得医生和 UC 患者难以接受, 严重影响 UC 的治疗效果^[16]。近年来研究表明, 多种黄酮类化合物如毛蕊异黄酮, 黄芩素, 刺芒柄花素等对炎性肠病有一定的改善作用^[10, 17-18]。本研究通过对 DSS 诱导的 UC 小鼠的体重、结肠组织病理及血清中 IL-1 β 和 IL-6 因子水平的检测, 表明三点金总黄酮, 毛蕊异黄酮及刺芒柄花素均可以抑制小鼠的体重下降、DAI 评分的增高; 通过 HE 染色及病理组织学评分得出三点金总黄酮和毛蕊异黄酮的改善效果优于刺芒柄花素; 然而对

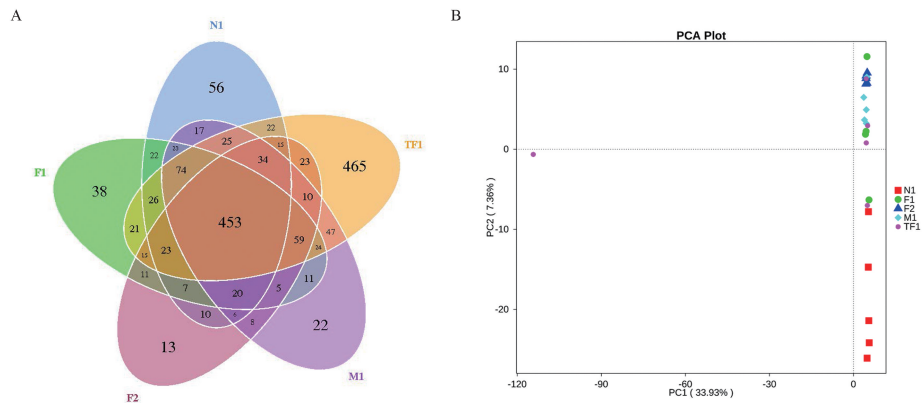


注: N1: 正常组; M1: 模型组; F1: 毛蕊异黄酮组; F2: 刺芒柄花素组; TF1: 三点金总黄酮组。

图 5 各组菌群多样性情况

Notes. N1, Control group. M1, Model group. F1, Calycosin group. F2, Formononetin group. TF1, Total flavones of *Desmodium triflorum* group.

Figure 5 Diversity of each group

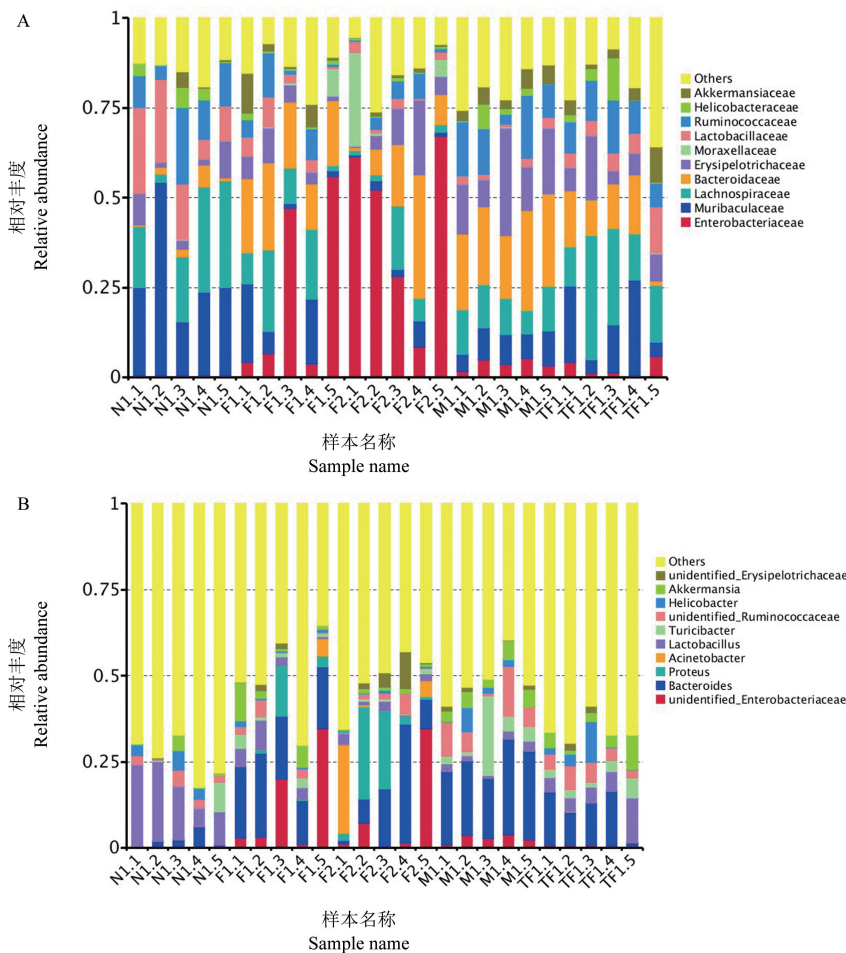


注: N1: 正常组; M1: 模型组; F1: 毛蕊异黄酮组; F2: 刺芒柄花素组; TF1: 三点金总黄酮组。

图 6 肠道菌群整体轮廓变化韦恩图和 PCA 分析

Notes. N1, Control group. M1, Model group. F1, Calycosin group. F2, Formononetin group. TF1, Total flavones of *Desmodium triflorum* group.

Figure 6 Venn and PCA analysis of changes in the overall profile of intestinal flora

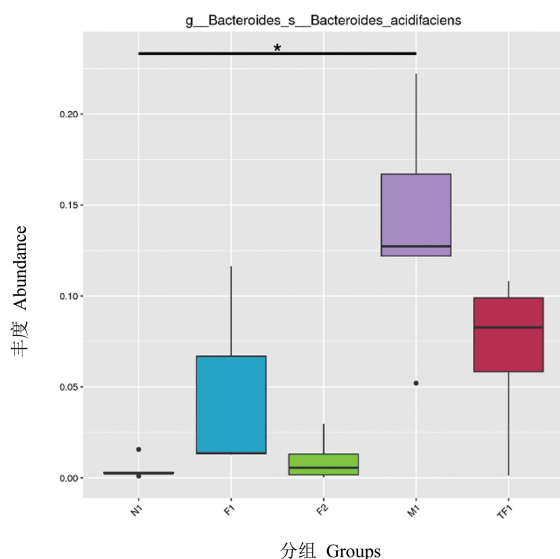


注: N1: 正常组; M1: 模型组; F1: 毛蕊异黄酮组; F2: 刺芒柄花素组; TF1: 三点金总黄酮组。

图 7 科水平和属水平小鼠肠道微生物的富集

Notes. N1, Control group. M1, Model group. F1, Calycosin group. F2, Formononetin group. TF1, Total flavones of *Desmodium triflorum* group.

Figure 7 Enrichment of intestinal microflora in mice at family level and genus level



注: N1: 正常组; M1: 模型组; F1: 毛蕊异黄酮组; F2: 刺芒柄花素组; TF1: 三点金总黄酮组。

图 8 机会致病菌拟杆菌

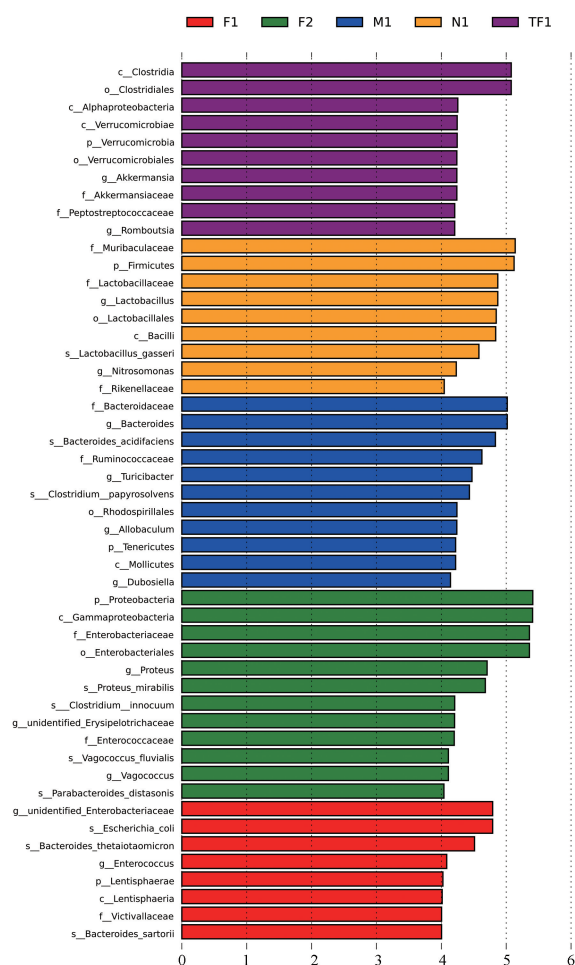
在小鼠肠道微生物中的富集

Notes. N1, Control group. M1, Model group. F1, Calycosin group. F2, Formononetin group. TF1, Total flavones of *Desmodium triflorum* group.

Figure 8 Enrichment of *Bacteroides acidifaciens* in intestinal microflora of mice

于 IL-1 β 、IL-6 水平的抑制效果, 则毛蕊异黄酮的效果优于三点金总黄酮和刺芒柄花素, 综上所述表明毛蕊异黄酮对于 UC 小鼠的治疗作用优于三点金总黄酮和刺芒柄花素。

肠道菌群与溃疡性结肠炎的发生发展关系密切, 越来越多的学者研究发现, 肠道菌群紊乱可能是溃疡性结肠炎发生、发展的始动因素^[19]。肠道正常菌群在肠道免疫系统的组成和营养物质的代谢, 肠道微生态平衡等多方面起到十分重要的作用。Nishikawa 等^[20]和吴瑞丽等^[21]发现 UC 患者人群的肠道菌群数量和结构多样性明显低于健康人群。梁淑文等^[22]通过比较 UC 与健康组的肠道菌群, 发现 UC 活动期优势菌乳酸杆菌、双歧杆菌、拟杆菌、真杆菌、消化球菌的菌群数量显著减少, 而条件致病菌如大肠杆菌、小梭菌菌群等数量显著增加。以上研究表明肠道细菌多样性降低、菌群结构的破坏以及致病菌的增加等导致的肠道菌群失衡在 UC 中起着重要的作用。黄酮类天然产物被证明能够抑制细菌生物膜的形成、抑制细菌的能量代谢, 抑制或杀死某些共生菌和病原体, 减少细菌产生的毒素如硫化氢和脂多糖, 进而改善肠道的生态平衡, 起



注: N1: 正常组; M1: 模型组; F1: 毛蕊异黄酮组; F2: 刺芒柄花素组; TF1: 三点金总黄酮组。

图 9 线性判别分析效应大小识别细菌的不同丰度

Notes. N1, Control group. M1, Model group. F1, Calycosin group. F2, Formononetin group. TF1, Total flavones of *Desmodium triflorum* group.

Figure 9 Linear discriminant analysis effect size to identify different abundances of bacteria

到改善溃疡性结肠炎的作用^[23]。

本研究探讨了三点金总黄酮, 毛蕊异黄酮及刺芒柄花素对 UC 小鼠肠道菌群的调节作用。结果显示, 三点金总黄酮和毛蕊异黄酮能够改善和部分恢复菌群多样性, 但是刺芒柄花素对菌群多样性却没有改善作用。徐豪明^[24]的研究证实在 TNBS 诱导结肠炎小鼠肠道菌群中, 条件致病菌拟杆菌和产酸拟杆菌的相对丰度明显升高, 而经 5-氨基水杨酸干预之后均显著下降。从目前的结果来看, 总黄酮的效果总体上优于其两个单体化合物, 这很可能系协同效果所致。刺芒柄花素没有提高物种多样性, 但是可能从降低条件致病菌拟杆菌而发挥作用。

综上所述,三点金总黄酮,毛蕊异黄酮以及刺芒柄花素对 UC 有一定的治疗作用且毛蕊异黄酮优于三点金总黄酮和刺芒柄花素,然而对于恢复肠道菌群多样性和改善肠道菌群结构来看,三点金总黄酮的效果总体上优于其两个单体化合物,这为 UC 治疗药物的研究提供了参考依据。

参考文献:

- [1] Liang J, Chen S, Chen J, et al. Therapeutic roles of polysaccharides from *Dendrobium officinale* on colitis and its underlying mechanisms [J]. Carbohydr Polym, 2018, 185: 159–168.
- [2] 蔺晓源, 余星, 雷贵明, 等. 健脾益肠散对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织 HSP70 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(22): 91–96.
- [3] 宁丽琴, 叶柏, 沈洪, 等. 国医大师徐景藩治疗溃疡性结肠炎的用药规律分析和分子靶点预测 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(5): 1042–1048.
- [4] Yamamoto T, Shimoyama T, Kuriyama M. Dietary and enteral interventions for Crohn's disease [J]. Curr Opin Biotechnol, 2017, 44: 69–73.
- [5] 马旭园, 代志峰, 王慧超, 等. 溃疡性结肠炎患者肠道菌群的变化及其与 IL-23/IL-17 轴的关系 [J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(5): 884–892.
- [6] Li K, Wang J, Wei J, et al. Fecal microbiota in pouchitis and ulcerative colitis [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(40): 8929–8939.
- [7] Kumagai H, Yokoyama K, Imagawa T, et al. Failure of fecal microbiota transplantation in a three-year-old child with severe refractory ulcerative colitis [J]. Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr, 2016, 19(3): 214–220.
- [8] Aguilera M, Darby T. The complex role of inflammasomes in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases lessons learned from experimental models [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2014, 25(6): 715–730.
- [9] 贾敏如, 李星炜. 中国民族药志要 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005.
- [10] Yang Q, Chen G, Yang Y, et al. Formononetin ameliorates DSS-induced ulcerative colitis in mice through induction of Nrf2 in colons [J]. J Chin Pharm Sci, 2016, 25(3): 178–188.
- [11] Chao L, Zheng P, Xia L, et al. Calycosin attenuates dextran sulfate sodium (DSS)-induced experimental colitis [J]. Iran J Basic Med Sci, 2017, 20(9): 1056–1062.
- [12] 谭悦, 关雅迪, 郑长清. 山姜素对葡聚糖硫酸钠诱导小鼠溃疡性结肠炎的保护作用及其作用机制研究 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(6): 1303–1311.
- [13] 孙洁, 包静瑶, 陈浩祎, 等. 不同维生素 B12 衍生物对 DSS 致小鼠结肠炎调控作用的研究 [J]. 世界华人消化杂志, 2019, 27(10): 611–617.
- [14] 郭雪艳. 双姜胃痛丸对葡聚糖硫酸钠诱导溃疡性结肠炎的改善作用及其机制研究 [D]. 昆明: 云南中医药大学, 2020.
- [15] Molodecky N, Soon I, Rabi D, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review [J]. Gastroenterology, 2015, 142(1): 46–54.
- [16] Wang K, Li Y, Lv Q, et al. Bergenin, acting as an agonist of PPAR γ , ameliorates experimental colitis in mice through improving expression of SIRT1, and therefore inhibiting NF- κ B-mediated macrophage activation [J]. Front Pharmacol, 2018, 8: 981–1000.
- [17] Nie X, Ou-yang J, Xing Y, et al. Calycosin inhibits migration and invasion through modulation of transforming growth factor beta-mediated mesenchymal properties in U87 and U251 cells [J]. Drug Des Devel Ther, 2016, 10(1): 767–779.
- [18] Wang W, Xia T, Yu X. Wogonin suppresses inflammatory response and maintains intestinal barrier function via TLR4-MyD88-TAK1-mediated NF- κ B pathway *in vitro* [J]. Inflamm Res, 2015, 64(6): 423–431.
- [19] 周正华. 肠道微环境与溃疡性结肠炎 [J]. 世界华人消化杂志, 2016, 24(11): 1695–1700.
- [20] Nishikawa J, Kudo T, Sakata S, et al. Diversity of mucosa-associated microbiota in active and inactive ulcerative colitis [J]. Scand J Gastroenterol, 2009, 44(2): 180–186.
- [21] 吴瑞丽, 孙自勤, 魏志. 溃疡性结肠炎肠道菌群结构 ERIC-PCR 指纹图谱分析 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2012, 21(9): 798–801.
- [22] 梁淑文, 王晓英, 屈昌民, 等. 溃疡性结肠炎患者肠道菌群变化的临床研究 [J]. 医学研究杂志, 2015, 44(9): 60–62.
- [23] Vezza T, Rodríguez-Nogales A, Algieri F, et al. Flavonoids in inflammatory bowel disease: A review [J]. Nutrients, 2016, 8(4): 211–232.
- [24] 徐豪明. PD-1 抑制剂对 TNBS 诱导肠炎小鼠肠道菌群及肠屏障作用的初步研究 [D]. 广州: 广州医科大学, 2018.

[收稿日期] 2021-04-07