紫云英苷调节肠道菌群缓解小鼠溃疡性结肠炎的作用机制Δ

黄　静[1*]，廖艳花[1]，莫昕莹[1]，杨裕婷[1]，蒋伟哲[2#]（1.右江民族医学院附属医院药学部，广西 百色　533000；2.广西医科大学药学院，南宁　530021）

中图分类号　R285.5；R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2025）14-1709-08
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2025.14.04

摘　要　目的　探究紫云英苷（AG）调节肠道菌群缓解小鼠溃疡性结肠炎（UC）的潜在作用机制。**方法**　将雄性C57BL/6小鼠随机分为正常组（CON组）、模型组[葡聚糖硫酸钠（DSS）组]、5-氨基水杨酸组（5-ASA组）、AG低剂量组和高剂量组（AGL、AGH组），每组8只。除CON组外，其余组小鼠以连续饮用3%DSS溶液7 d的方式建立小鼠UC模型；随后，将3%DSS溶液换为水，各药物组小鼠灌胃相应药液，CON组和DSS组小鼠灌胃等体积生理盐水，每天1次，连续7 d。末次灌胃后，比较各组小鼠的体重变化指数、疾病活动指数（DAI）评分、结肠长度和脾脏指数、炎症因子（肿瘤坏死因子α、白细胞介素1β、白细胞介素6）水平；观察各组小鼠结肠组织的病理改变，并比较其病理学评分、杯状细胞占比；检测各组小鼠肠道屏障相关因子[闭合蛋白（occludin）和紧密连接蛋白ZO-1]和炎症相关因子[沉默信息调节因子1（SIRT1）、c-Jun氨基末端激酶（JNK）和p38丝裂原活化的蛋白激酶（p38 MAPK）]mRNA的表达情况；分析各组小鼠的肠道菌群变化情况并检测其肠道代谢物短链脂肪酸水平（SCFAs）含量；以DSS、AG处理的粪菌液为干预手段，通过粪便菌群移植实验进一步验证AG的抗UC机制。**结果**　与CON组比较，DSS组小鼠肠道黏膜结构受损严重，炎症细胞跨壁浸润明显；其体重变化指数，结肠长度，杯状细胞占比，occludin、ZO-1、SIRT1 mRNA的表达，Chao1和Shannon指数，乙酸和丁酸含量均显著降低、缩短或下调（$P<0.05$）；DAI评分、脾脏指数、炎症因子水平、病理学评分和p38 MAPK、JNK mRNA的表达均显著升高或上调（$P<0.05$）。与DSS组比较，AG各剂量组小鼠结肠组织病变有不同程度好转，上述各定量指标均普遍回调（$P<0.05$），且AG处理的粪菌液的干预作用与AG基本一致。**结论**　AG可改善UC小鼠的相关症状，减轻其炎症反应和结肠组织病理改变；上述作用可能与调节小鼠肠道菌群多样性，增加丁酸、丙酸含量，促进结肠黏膜屏障的修复，进而调控SIRT1/p38 MAPK炎症通路相关基因表达有关。

关键词　紫云英苷；溃疡性结肠炎；肠道菌群；炎症；短链脂肪酸

Mechanism of astragalin in allevating ulcerative colitis in mice through modulation of the intestinal flora

HUANG Jing[1], LIAO Yanhua[1], MO Xinying[1], YANG Yuting[1], JIANG Weizhe[2]（1. Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Guangxi Baise 533000, China; 2. School of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To explore the potential mechanisms of astragalin (AG) in allevating ulcerative colitis (UC) in mice through modulation of the intestinal flora. **METHODS** Male C57BL/6 mice were randomly divided into normal group (CON group), model group [dextran sodium sulfate (DSS) group], 5-aminosalicylic acid group (5-ASA group), AG low-dose group and high-dose group (AGL and AGH groups), with 8 mice in each group. The mice UC model was established by drinking 3% DSS solution continuously for 7 days in all groups except the CON group. After that, 3% DSS solution was replaced by water, and the mice of each drug group were gavaged with the corresponding drug solution. Mice in the CON and DSS groups were gavaged with an equal volume of normal saline, once a day, for 7 days. After the last gavage, the body weight change index, disease activity index (DAI) score, colon length and spleen index, and levels of inflammatory factors (tumor necrosis factor-α, interleukin-1β, interleukin-6) were compared among the mice in each group; pathological changes in colonic tissues of the mice were observed in each group, and the pathological score and the percentage of goblet cells were compared; mRNA expressions of barrier-related factors [occludin and ZO-1] and inflammation-related factors [silencing information regulatory factor 1 (SIRT1), c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK)] were detected in each group of mice; the changes in the intestinal flora of mice in each group were analyzed and the contents of intestinal metabolites short-chain fatty acids (SCFAs) was determined. Using DSS and AG-treated fecal bacterial liquid as an intervention, the mechanism of anti-UC effect of AG was further verified by a fecal microbiota

Δ**基金项目** 国家自然科学基金项目（No.82460806）

＊**第一作者** 主管药师，硕士研究生。研究方向：中药药理学。电话：0776-2835884。E-mail：734581428@qq.com

＃**通信作者** 教授，硕士生导师，博士。研究方向：中药研究与开发。电话：0771-4528697。E-mail：jiangweizhe@gxmu.edu.cn

transplant experiment. **RESULTS** Compared with the CON group, the intestinal mucosal structure of mice in the DSS group was severely damaged, with obvious infiltration of inflammatory cells collapsing the wall; their body weight change index, colon length, the percentage of goblet cells, mRNA expressions of occludin, ZO-1 and SIRT1, Chao1 and Shannon indexes, and contents of acetic acid and butyric acid were significantly reduced, shortened or down-regulated ($P<0.05$); however, DAI score, spleen index, levels of inflammatory factors, pathological score, as well as mRNA expressions of p38 MAPK and JNK, were all significantly increased or up-regulated ($P<0.05$). Compared with the DSS group, colon tissue lesions of AG mice in all dose groups showed different degrees of improvement, and the above quantitative indexes were generally regressed ($P<0.05$), and the intervention effect of AG-treated fecal bacterial fluid was basically the same as that of AG. **CONCLUSIONS** AG can improve relevant symptoms in UC mice and reduce their inflammatory response and colonic histopathological changes. The above effects may be related to regulating the diversity of intestinal flora in mice, increasing the contents of butyric acid and propionic acid, and promoting the repair of the colonic mucosal barrier, thus regulating the expressions of genes related to the SIRT1/p38 MAPK inflammatory pathway.

KEYWORDS astragalin; ulcerative colitis; intestinal flora; inflammation; short-chain fatty acids

溃疡性结肠炎（ulcerative colitis，UC）发病机制复杂，涉及肠道屏障功能受损、黏膜持续性炎症及肠道菌群紊乱等多种因素，其中肠道菌群紊乱已被证实是促进UC进展的关键因素[1]。研究指出，致病菌分泌的肠毒素可增加肠道上皮细胞的通透性，导致位于肠腔内的细菌及其产物进入肠道黏膜固有层，从而引发异常的炎症反应[2]；同时，在持续的炎症环境下，肠道黏膜固有层不断受到多种致病因子的侵袭，进一步加速UC恶化[3]。目前，UC临床治疗的常用药物包括氨基水杨酸制剂、类皮质激素、免疫抑制剂等药物，然而这些药物存在副作用大、根治效果不佳等不足，加之患者长期用药经济负担较大，故开发安全有效的UC治疗药物具有重要意义。

紫云英苷（astragalin，AG）存在于黄芪、辣木叶、百蕊草等多种中草药中，是一种生物活性广泛的天然黄酮类成分，药用价值高。近期研究表明，AG可通过减轻炎症细胞浸润和调节肠道菌群来缓解脂多糖诱导的小鼠肠黏膜屏障损伤[4]；另一项研究发现，AG可通过抑制核因子κB激活来减轻结肠炎症状[5]；同时，这两项研究均指出，AG可提高与短链脂肪酸（short-chain fatty acids，SCFAs）生成密切相关的肠道菌群的数量，但均未对AG干预SCFAs的效果进行探索，亦未明确AG对肠道菌群的干预作用是否与小鼠UC症状的改善直接相关。近年来，粪便菌群移植（fecal microbiota transplant，FMT）作为一种通过调节肠道菌群紊乱、重塑肠道菌群结构而影响生物转运通路或代谢过程的实验方法，被广泛用于肠道疾病的相关研究中[6]。基于此，本研究拟利用葡聚糖硫酸钠（dextran sodium sulfate，DSS）诱导构建UC小鼠模型，验证AG对小鼠UC症状的改善作用，并探索该成分对肠道菌群及SCFAs的影响；同时，本研究拟结合FMT实验，探讨AG的抗UC作用是否与该成分对肠道菌群的调节作用直接相关，以期为AG改善UC作用机制的阐释及其临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括ELX-808IU型酶联免疫检测仪（美国BioTek公司）、DMi8型倒置显微镜（日本Olympus公司）、Thermo Trace 1300型气相系统和Thermo ISQ7000型质谱仪（美国Thermo Fisher Scientific公司）、ViiA7型实时荧光定量聚合酶链式反应（PCR）仪（美国ABI公司）等。

1.2 主要药品与试剂

AG原料药（纯度99.63%，批号RP22052201）购自成都麦德生科技有限公司；5-氨基水杨酸（5-aminosalicylic acid，5-ASA）原料药（阳性对照，纯度≥98%，批号A823148）购自上海麦克林生化科技股份有限公司；DSS（批号MB5535-1）购自大连美仑生物技术有限公司；肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、白细胞介素6（interleukin-6，IL-6）、IL-1β试剂盒（批号分别为20231220、20231220、20231220）均购自上海科兴商贸有限公司；TriQuick总RNA提取试剂、2×SYBR Green定量PCR混合物、一步cDNA合成试剂盒、阿利新蓝-过碘酸-雪夫染色（Alcian blue and periodic acid-Schiff staining，AB-PAS）试剂盒、苏木精-伊红（hematoxylin-eosin，HE）染色试剂盒（批号分别为20231128、20231210、20231213、G1285、G1120）均购自北京索莱宝科技有限公司；闭合蛋白（occludin）、紧密连接蛋白ZO-1、c-Jun氨基末端激酶（c-Jun N-terminal kinase，JNK）、p38丝裂原活化的蛋白激酶（p38 mitogen-activated protein kinase，p38 MAPK）、沉默信息调节因子1（silencing information regulatory factor 1，SIRT1）、β-肌动蛋白（β-actin）实时定量PCR实验相关引物由上海欧易生物医学科技有限公司设计、合成。

1.3 实验动物

SPF级雄性C57BL/6小鼠，6～8周龄，体重20～22 g，购自斯贝福（北京）生物技术有限公司，动物生产许可证为SCXK（京）2019-0010。所有小鼠均饲养于广西医科大学药学院动物饲养中心[温度（25±2）℃，相对湿度55%～65%，昼夜交替]，自由摄食、饮水。本实验方案已通过广西医科大学实验动物伦理委员会审批（编号202310012）。

2 方法

2.1 AG对UC小鼠的改善作用评价

2.1.1 造模、分组与给药

取小鼠40只，适应性喂养7 d后，随机分为正常对照组（CON组）、模型组（DSS组）、阳性对照组（5-ASA组）、紫云英苷低剂量组（AGL组）和高剂量组（AGH组），每组8只。在实验的第1～7天，除CON组小鼠自由饮水外，其余各组小鼠均饮用3%DSS溶液（若出现活动减少、立毛、体重下降、腹泻和便血等症状，则认为UC模型构建成功[7]）；在实验的第8～14天，将3%DSS溶液换为水，同时5-ASA组小鼠灌胃100 mg/kg的5-ASA，AGL、AGH组小鼠分别灌胃50、100 mg/kg的AG，灌胃体积均为0.02 mL/g，每天1次（以生理盐水为溶剂，药物剂量均参考既往研究设置[5]）；CON组、DSS组小鼠灌胃等体积生理盐水，每天1次。

2.1.2 小鼠体重变化指数、活动性疾病指数、结肠长度、脾脏指数检测

实验期间，观察各组小鼠的体重变化情况，于末次给药后计算其体重变化指数[即末次给药后（第14天）与饮用3%DSS溶液首日（第1天）的体重之比]，并进行活动性疾病指数（disease activity index，DAI）评价。DAI评分为体重变化、粪便稠度、粪便隐血度3项评分的平均值，具体标准为——（1）体重变化评分：体重减轻＜1%，记0分；体重减轻1%～＜5%，记1分；体重减轻5%～＜10%，记2分；体重减轻10%～＜15%，记3分；体重减轻≥15%，记4分。（2）粪便稠度评分：粪便正常，记0分；便稀，记2分；明显腹泻，记4分。（3）粪便隐血度评分：粪便无隐血，记0分；隐血阳性，记2分；明显出血，记4分[8]。末次给药2 h后，各组小鼠以颈椎脱臼法处死，分离其结肠并测量结肠长度，分离脾脏、称重并计算脾脏指数（脾脏指数＝脾重/体重×100%）。

2.1.3 小鼠结肠组织中炎症因子检测

取各组小鼠结肠组织适量，加9倍量的磷酸盐缓冲液（PBS），匀浆，离心20 min后，收集上清液，参照相应试剂盒说明书操作，使用酶标仪检测其中炎症因子（TNF-α、IL-1β、IL-6）水平。

2.1.4 小鼠结肠组织病理形态观察和杯状细胞占比检测

取各组小鼠结肠组织适量（因经费原因，结合前述实验结果，本研究仅从上述组别中随机选择3只小鼠的结肠组织进行考察），以4%多聚甲醛溶液固定，经脱水、石蜡包埋后切片；切片经脱蜡、乙醇梯度脱水后，进行HE染色，使用显微镜观察小鼠结肠组织的病理学形态并进行病理学评分。该评分为炎症评分和组织损伤评分之和，具体标准为——（1）炎症评分：肠道黏膜固有层无炎症细胞，记0分；肠道黏膜固有层炎症细胞数量增加，记1分；炎症细胞延伸至黏膜下层，记1.5分；炎症细胞跨壁浸润，记2分。（2）组织损伤评分：无黏膜损伤，记0分；可见离散性上皮损伤，记1分；可见表面黏膜糜烂，记1.5分；存在广泛的黏膜损伤并延伸至肠壁深部结构，记2分[8]。取各组小鼠结肠组织切片，同法处理后，进行AB-PAS，使用显微镜观察并采用Image J软件评估各组小鼠结肠杯状细胞占比（杯状细胞被染为蓝色，以其染色面积在总面积中的百分占比表示）的变化情况。

2.1.5 小鼠结肠组织中肠道屏障及炎症相关因子mRNA表达检测

采用实时定量PCR法检测。取CON组、DSS组、AGH组小鼠结肠组织适量（因经费原因，结合前述实验结果，本研究仅从上述组别中随机选择3只小鼠的结肠组织进行考察），严格按照试剂盒说明书方法提取其总RNA并逆转录合成cDNA。经浓度、纯度检测后，以此cDNA为模板，进行PCR扩增。PCR反应体系共10 μL，包括cDNA模板1 μL、2×SYBR Green定量PCR混合物5 μL、正向/反向引物（各引物系列及产物长度见表1）各0.2 μL、无核酶水3.6 μL。反应条件为94 ℃预变性30 s；94 ℃变性5 s，60 ℃退火/延伸30 s，共45个循环。以*β*-actin为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算肠道屏障相关因子（occludin、ZO-1）和炎症相关因子（p38 MAPK、JNK、SIRT1）mRNA的相对表达量。

表1 PCR引物及产物长度

目的基因	引物序列（5′→3′）	产物长度/bp
occludin	正向：CTCGGTACAGCAGCAATGGT	117
	反向：TCATAGTGGTCAGGGTCCGT	
ZO-1	正向：CAGAACCAAAGCCTGTGTATG	150
	反向：TTAGGTAGGACACCATCAGATGGA	
p38 MAPK	正向：GCTCGGTGTGTGCTGCTTTT	104
	反向：CCTGTAGGTCCTTTTGGCGT	
JNK	正向：TGTTTCCTGATGTGCTTTTCC	233
	反向：CTCCTCTATTGTGTGCTCCCT	
SIRT1	正向：TAGACAGGCTGGAACAGGTTG	203
	反向：GGTTTGATGATAGCAAGCGG	
β-actin	正向：GGCTCCTAGCACCATGAAGA	187
	反向：AGCTCAGTAACAGTCCGCC	

2.1.6 小鼠肠道菌群检测

取CON组、DSS组、AGH组小鼠的粪便样品（考虑到小鼠个体间肠道菌群及其代谢物差异度比一般生化

分子指标明显，且测序仪器精密度要求的样品数≥5，因此本研究仅从上述组别中随机选取5只小鼠的样品进行测定，“2.1.7”项同），按照DNA提取试剂盒说明提取总DNA，经质量检测后，扩增细菌16S rRNA的V3+V4可变区（引物338F：5′-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3′，806R：5′-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3′）。取所得PCR产物，经定量后构建微生物多样性测序文库，采用Illumina MiSeq平台进行高通量测序，使用QIIME2软件读取测序结果，并根据操作分类单元聚类分析结果进行多样性指数（Chao1和Shannon指数）分析、群落聚类分析，并根据分类信息对各分类层次的群落结构进行统计和线性判别分析（即LEfSe分析）。上述实验委托上海欧易生物医学科技有限公司完成。

2.1.7　小鼠粪便中SCFAs含量检测

取CON组、DSS组、AGH组小鼠的粪便样品适量，置于离心管中，加水适量，匀浆1 min，于4 ℃下离心10 min；取上清液，加15%磷酸溶液+375 μg/mL的4-甲基戊酸溶液+乙醚混合溶液（体积比为5∶1∶14），匀浆1 min，再于4 ℃下离心10 min；取上清液，即得供试品溶液。取上述各组供试品溶液，采用气质联用（GC-MS）技术以内标法检测其中乙酸、丁酸、丙酸、戊酸的含量。GC-MS条件如下：色谱柱为Agilent HP-INNOWAX毛细管柱（30 m×0.25 mm，0.25 μm）；进样口温度为250 ℃；载气为氦气；流速为1.0 mL/min；分流进样，进样量为1 μL，分流比为10∶1；程序升温，起始温度为90 ℃，然后以10 ℃/min升温至120 ℃，再以5 ℃/min升温至150 ℃，最后以25 ℃/min升温至250 ℃并维持2 min。电离源为电子轰击电离源；离子源温度为300 ℃，传输线温度为250 ℃；以选择离子监测（selected ion monitoring，SIM）模式进行正离子扫描；电子能量为70 eV。以待测成分与内标（4-甲基戊酸）的峰面积比值为纵坐标（Y）、待测成分质量浓度为横坐标（X），得乙酸、丁酸、丙酸、戊酸的回归方程分别为Y=0.006 04X+0.002 48（r=0.996 8）、Y=0.032 05X+0.000 58（r=0.997 9）、Y=0.009 53X+0.000 51（r=0.998 1）、Y=0.042 10X+0.000 78（r=0.991 8），其检测质量浓度的线性范围均为0.02～500.00 μg/mL。该法精密度、重复性等方法学考察均符合2020版《中国药典》（四部）的相关规定。上述实验委托上海欧易生物医学科技有限公司完成。

2.2　AG抗UC作用与其对肠道菌群影响的相关性验证

采用FMT实验考察AG抗UC作用是否与该成分对肠道菌群的调节作用直接相关。

2.2.1　分组、造模与给药

参照既往研究方案[9]，取小鼠48只，分为受体小鼠（24只）和供体小鼠（24只）。取供体小鼠，随机分为CON组、DSS组、AGH组，每组8只，按“2.1.1”项下方法造模、干预。取受体小鼠，将其饮用水换为抗菌药物混合物溶液（含万古霉素0.5 g/L、氨苄西林1 g/L、甲硝唑1 g/L、硫酸新霉素1 g/L），持续饮用14 d以消耗肠道菌群，然后再随机分为FMT-CON组、FMT-DSS组、FMT-AGH组，每组8只。在随后的第1～7天，除FMT-CON组小鼠自由饮水外，其余各组小鼠均饮用3%DSS溶液；从第8天起，将3%DSS溶液换为水，同时取供体小鼠粪便，加10倍量生理盐水稀释，涡旋混匀5 min，取上清液，按每只200 μL的体积灌胃至受体小鼠体内（FMT-CON组、FMT-DSS组、FMT-AGH组分别对应CON组、DSS组、AGH组），每天1次，持续灌胃7 d。

2.2.2　小鼠相关指标的检测

末次灌胃后，按“2.1.2”项下方法计算FMT-CON组、FMT-DSS组、FMT-AGH组小鼠的体重变化指数；同时，进行DAI评分、结肠长度测量和脾脏指数计算；分别按“2.1.3”～“2.1.5”项下方法检测或观察上述3组小鼠结肠组织中的炎症因子（TNF-α、IL-1β、IL-6）水平，结肠组织病理形态、病理学评分和杯状细胞占比，以及结肠组织中occludin、ZO-1、p38 MAPK、JNK、SIRT1 mRNA的表达情况（除染色观察和mRNA检测取每组3小鼠的组织样本外，其余指标均取每组8只小鼠检测）。

2.3　统计学方法

采用SPSS 23.0软件进行数据统计分析，GraphPad Prism 8软件绘制图表。实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-t检验。检验水准α=0.05。

3　结果

3.1　AG对UC小鼠改善作用的实验结果

3.1.1　AG对UC小鼠体重变化指数、DAI评分、结肠长度和脾脏指数的影响

与CON组比较，DSS组小鼠体重变化指数和结肠长度均显著降低或缩短，DAI评分、脾脏指数均显著升高（P<0.05）。与DSS组比较，各药物组小鼠体重变化指数、结肠长度均显著升高或延长，DAI评分（AGL组除外）、脾脏指数均显著降低（P<0.05）。结果见表2。

表2　各组小鼠体重变化指数、DAI评分、结肠长度和脾脏指数比较（$\bar{x}\pm s$，n=8）

组别	体重变化指数	DAI评分/分	结肠长度/cm	脾脏指数
CON组	1.06±0.04	0.17±0.31	6.30±0.47	1.68±0.23
DSS组	0.84±0.06[a]	2.71±0.60[a]	4.81±0.43[a]	2.65±0.76[a]
5-ASA组	0.94±0.03[b]	1.38±0.42[b]	5.58±0.64[b]	1.82±0.38[b]
AGL组	0.90±0.05[b]	2.38±0.97	5.35±0.57[b]	1.97±0.62[b]
AGH组	0.93±0.06[b]	1.84±0.59[b]	5.73±0.34[b]	2.02±0.46[b]

a：与CON组比较，P<0.05；b：与DSS组比较，P<0.05。

3.1.2　AG对UC小鼠结肠组织中炎症因子水平的影响

与CON组比较，DSS组小鼠结肠组织中TNF-α、IL-1β、IL-6水平均显著升高（P<0.05）；与DSS组比较，各药物组小鼠结肠组织中TNF-α（AGL组除外）、IL-1β（AGL组除外）、IL-6（AGH组除外）水平均显著降低（P<0.05）。结果见表3。

表3　各组小鼠结肠组织中炎症因子水平及病理学评分、杯状细胞占比比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	TNF-α（n=8）/（ng/mL）	IL-1β（n=8）/（μg/mL）	IL-6（n=8）/（μg/mL）	病理学评分（n=3）/分	杯状细胞占比（n=3）/%
CON组	1.97±0.11	711.68±130.71	315.84±124.11	0.23±0.23	30.93±5.21
DSS组	2.27±0.22[a]	937.25±150.31[a]	497.06±108.38[a]	3.83±1.04[a]	9.88±4.77[a]
5-ASA组	1.83±0.45[b]	793.21±135.81[b]	368.71±121.98[b]	2.00±0.50[b]	22.36±1.82[b]
AGL组	2.08±0.20	833.50±140.94	377.09±90.01[b]	2.67±0.58	18.59±4.27
AGH组	1.98±0.34[b]	813.52±150.54[b]	388.93±125.35	2.33±0.76[b]	23.02±6.75[b]

a：与CON组比较，P<0.05；b：与DSS组比较，P<0.05。

3.1.3　AG对UC小鼠结肠组织病理形态和杯状细胞占比的影响

与CON组比较，DSS组小鼠结肠黏膜结构严重受损，隐窝结构不完整，局部有轻至重度坏死，大量炎症细胞跨壁浸润；其病理学评分显著升高而杯状细胞占比显著减少（P<0.05）。与DSS组比较，各药物组小鼠结肠黏膜结构均有不同程度改善，隐窝破坏有所减少，上皮结构逐渐完整，炎症细胞浸润有所减少；其病理学评分（AGL组除外）均显著降低而杯状细胞占比（AGL组除外）均显著增多（P<0.05）。结果图1、图2、表3。

3.1.4　AG对UC小鼠结肠组织中肠道屏障及炎症相关因子mRNA表达的影响

与CON组比较，DSS组小鼠结肠组织中occludin、ZO-1、SIRT1 mRNA的表达均显著下调，p38 MAPK、JNK mRNA的表达均显著上调（P<0.05）。与DSS组比较，AGH组小鼠结肠组织中occludin、ZO-1、SIRT1 mRNA的表达均显著上调，p38 MAPK mRNA的表达显著下调（P<0.05）。结果见表4。

3.1.5　AG对UC小鼠肠道微生物群结构及组成的影响

多样性结果显示，与CON组（Chao1指数：1 444.55±636.26；Shannon指数：7.33±0.51）比较，DSS组的Chao1指数（521.77±281.08）、Shannon指数（5.21±0.48）均显著降低（P<0.05）；与DSS组比较，AGH组小鼠Chao1指数（1 071.43±148.20）、Shannon指数（6.22±0.23）均显著升高（P<0.05）。微生物群落聚类分析结果（图3A）显示，DSS组小鼠的群落聚类区域明显偏离CON组，而AGH组的群落聚类区域则接近于CON组。微生物组成分析结果（图3B）显示，在门水平上，DSS组小鼠肠道菌群中的厚壁菌门与拟杆菌门的相对丰度比值（Firmicutes/Bacteroidetes）、变形菌门Proteobacteria的相对丰度均较CON组显著升高（P<0.05）；而AGH可显著扭转这一趋势（P<0.05）。LEfSe分析结果（图3C）显示，CON组的代表性物种有9个，包括拟杆菌门Bacteroidetes、普氏菌属*Prevotella*等；DSS组为16个，包括大肠埃希菌-志贺氏菌属*Escherichia-Shigella*、肠球菌属*Enterococcus*等；AGH组为8个，如乳杆菌科Lactobacillaceae和双歧杆菌属*Bifidobacterium*等。

表4　各组小鼠结肠组织中肠道屏障及炎症相关因子mRNA的相对表达量比较（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	occludin mRNA	ZO-1 mRNA	p38 MAPK mRNA	JNK mRNA	SIRT1 mRNA
CON组	0.96±0.24	0.97±0.20	0.69±0.27	0.78±0.30	0.79±0.22
DSS组	0.52±0.09[a]	0.53±0.12[a]	1.45±0.45[a]	2.91±1.31[a]	0.29±0.02[a]
AGH组	1.14±0.14[b]	0.80±0.02[b]	0.78±0.23[b]	1.94±0.74	0.78±0.18[b]

a：与CON组比较，P<0.05；b：与DSS组比较，P<0.05。

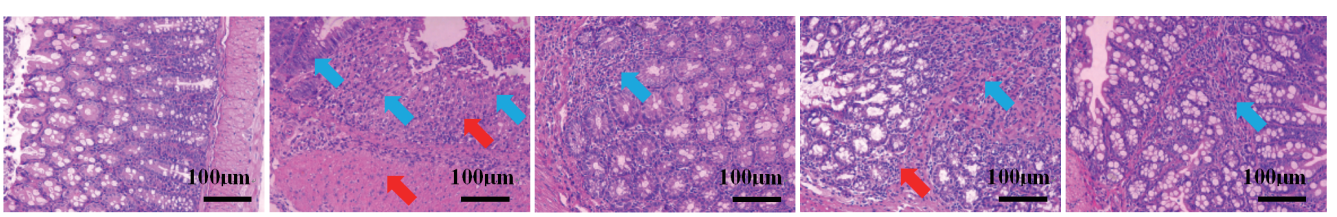
3.1.6　AG对UC小鼠肠道代谢物SCFAs含量的影响

与CON组比较，DSS组小鼠粪便样品中乙酸、丁酸含量均显著降低（P<0.05）；与DSS组比较，AGH组小鼠粪便样品中丁酸、丙酸含量均显著升高（P<0.05）。结果见表5。

3.2　AG抗UC作用与其对肠道菌群影响的相关性验证结果

3.2.1　FMT下AG对UC小鼠体重变化指数、DAI评分、结肠长度、脾脏指数的影响

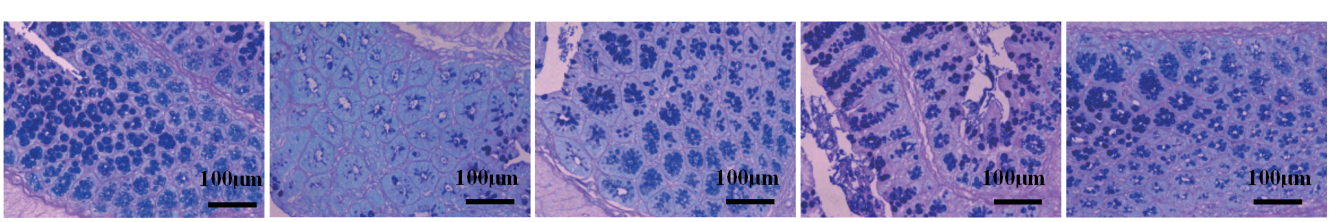
与FMT-CON组比较，FMT-DSS组小鼠体重变化指数、结肠长度均显著降低或缩短，DAI评分和脾脏指数均显著升高（P<0.05）；与FMT-DSS组比较，FMT-AGH组小鼠的结肠长度显著延长，DAI评分显著降低（P<0.05）。结果见表6。



A. CON组　B. DSS组　C. 5-ASA组　D. AGL组　E. AGH组

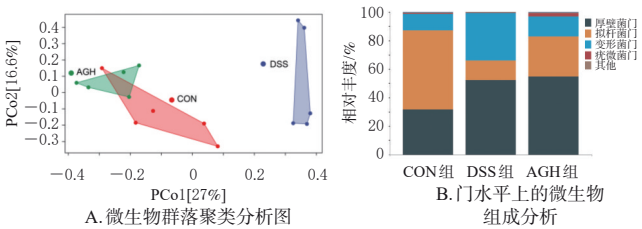
蓝色箭头：组织结构损伤；红色箭头：炎症细胞浸润。

图1　各组小鼠结肠组织病理形态的显微观察图（HE染色）

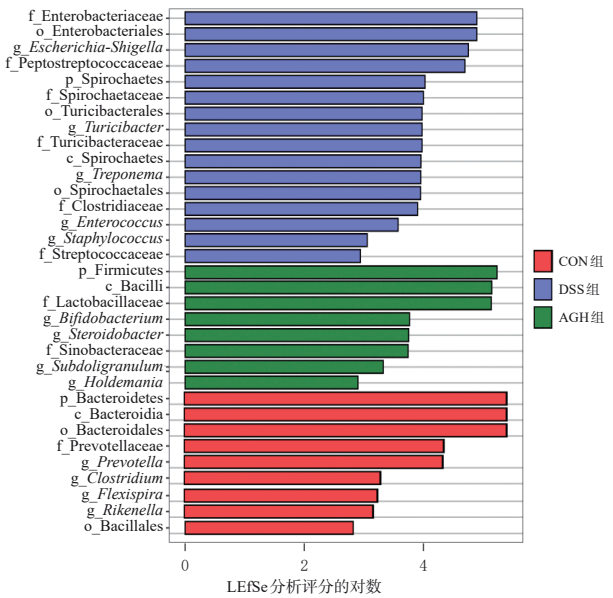


A. CON组　B. DSS组　C. 5-ASA组　D. AGL组　E. AGH组

图2　各组小鼠结肠杯状细胞的显微观察图（AB-PAS）



A. 微生物群落聚类分析图　　B. 门水平上的微生物组成分析



C. LEfSe分析图

图3　AG对UC小鼠肠道菌群结构和组成的影响

表5　各组小鼠肠道代谢物SCFAs含量比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$，μg/g）

组别	乙酸	丁酸	丙酸	戊酸
CON组	2 314.42±388.39	995.36±452.85	493.38±114.06	61.54±12.99
DSS组	1 548.19±456.94[a]	426.49±173.10[a]	337.58±168.94	55.60±19.47
AGH组	2 015.38±638.64	1 082.61±493.72[b]	563.55±182.42[b]	54.70±22.29

a：与CON组比较，$P<0.05$；b：与DSS组比较，$P<0.05$。

表6　FMT下各组小鼠体重变化指数、DAI评分、结肠长度、脾脏指数比较（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	体重变化指数	DAI评分/分	结肠长度/cm	脾脏指数
FMT-CON组	1.05±0.12	0.08±0.15	5.86±0.52	1.63±0.47
FMT-DSS组	0.84±0.10[a]	2.66±0.92[a]	4.94±0.60[a]	3.10±0.90[a]
FMT-AGH组	0.93±0.08	1.83±1.01[b]	5.56±0.47[b]	2.56±0.65

a：与FMT-CON组比较，$P<0.05$；b：与FMT-DSS组比较，$P<0.05$。

3.2.2　FMT下AG对UC小鼠结肠组织中炎症因子水平的影响

与FMT-CON组比较，FMT-DSS组小鼠结肠组织中TNF-α、IL-1β、IL-6水平均显著升高（$P<0.05$）；与FMT-DSS组比较，FMT-AGH组小鼠结肠组织中TNF-α、IL-1β水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见表7。

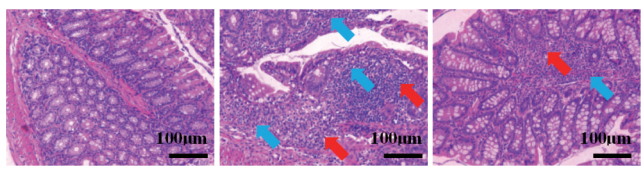
3.2.3　FMT下AG对UC小鼠结肠组织病理形态和杯状细胞占比的影响

与FMT-CON组比较，FMT-DSS组小鼠肠道黏膜结构严重受损，局部有轻至重度坏死，炎症细胞跨壁浸润严重；其病理学评分显著升高而杯状细胞占比显著减少（$P<0.05$）。与FMT-DSS组比较，FMT-AGH组小鼠的结肠黏膜结构明显改善，上皮结构相对完整，炎症细胞浸润减少；其病理评分显著降低而杯状细胞占比显著增多（$P<0.05$）。结果见表7、图4、图5。

表7　FMT下各组小鼠结肠组织中炎症因子水平及病理学评分、杯状细胞占比比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	TNF-α（$n=8$）/（ng/mL）	IL-1β（$n=8$）/（μg/mL）	IL-6（$n=8$）/（μg/mL）	病理学评分（$n=3$）/分	杯状细胞占比（$n=3$）/%
FMT-CON组	0.96±0.13	1 075.25±106.89	684.14±107.89	0.17±0.28	28.70±4.83
FMT-DSS组	1.17±0.10[a]	1 242.45±99.79[a]	804.95±111.37[a]	3.83±0.29[a]	9.42±4.85[a]
FMT-AGH组	1.04±0.07[b]	1 131.09±98.14[b]	764.26±129.11	2.83±0.76[b]	25.33±7.50[b]

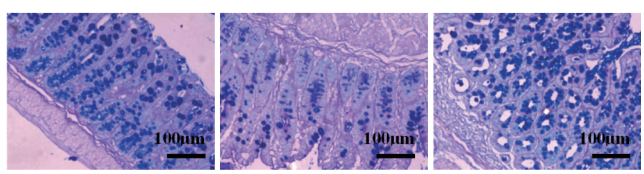
a：与FMT-CON组比较，$P<0.05$；b：与FMT-DSS组比较，$P<0.05$。



A. FMT-CON组　　B. FMT-DSS组　　C. FMT-AGH组

蓝色箭头：组织结构损伤；红色箭头：炎症细胞浸润。

图4　FMT下各组小鼠结肠组织病理形态的显微观察图（HE染色）



A. FMT-CON组　　B. FMT-DSS组　　C. FMT-AGH组

图5　FMT下各组小鼠结肠杯状细胞的显微观察图（AB-PAS）

3.2.4　FMT下AG对UC小鼠结肠组织中肠道屏障及炎症相关因子mRNA表达的影响

与FMT-CON组比较，FMT-DSS组小鼠结肠组织中occludin、ZO-1 mRNA的表达均显著下调，p38 MAPK、JNK mRNA的表达均显著上调（$P<0.05$）；与FMT-DSS组比较，FMT-AGH组小鼠结肠组织中ZO-1、SIRT1 mRNA的表达均显著上调，p38 MAPK mRNA的表达显著下调（$P<0.05$）。结果见表8。

表8　FMT下各组小鼠结肠组织中肠道屏障及炎症相关因子mRNA表达比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	occludin mRNA	ZO-1 mRNA	p38 MAPK mRNA	JNK mRNA	SIRT1 mRNA
FMT-CON组	1.20±0.22	1.11±0.30	0.66±0.32	0.63±0.37	1.71±0.93
FMT-DSS组	0.39±0.12[a]	0.53±0.20[a]	1.97±0.73[a]	1.64±0.74[a]	0.61±0.52
FMT-AGH组	1.06±0.55	1.22±0.32[b]	0.95±0.40[b]	0.99±0.09	2.62±1.35[b]

a：与FMT-CON组比较，$P<0.05$；b：与FMT-DSS组比较，$P<0.05$。

4　讨论

UC是一种以结肠持续性弥散性炎症为主要特征的疾病，其临床表现包括便血、腹泻、结肠缩短及体重减轻等症状[10]；此外，基于DSS致UC小鼠模型的研究结果显示，当机体处于炎症表达亢进状态时，脾脏细胞可明显增殖，表现为小鼠脾指数显著升高[11]。本研究结果显示，经DSS诱导后，小鼠DAI评分和脾脏指数均显著升

高，结肠长度和体重变化指数均显著缩短或降低，提示UC模型复制成功；经不同剂量的AG干预后，UC小鼠的DAI评分和脾脏指数均有不同程度降低，结肠长度和体重变化指数均显著延长或升高，提示AG能够有效缓解UC小鼠的相关症状。

结肠内异常亢进的炎症反应是UC的典型病理特征。作为UC的关键促炎介质，TNF-α、IL-6、IL-1β水平的异常升高会干扰肠道分泌功能，破坏肠道紧密连接结构，促使上皮通透性增强，进而导致UC发生或恶化[12—13]。本研究结果显示，与CON组比较，UC小鼠结肠组织内可见大量的炎症细胞跨壁浸润，且TNF-α、IL-6、IL-1β水平均显著升高；经不同剂量AG干预后，UC小鼠结肠组织中的炎症细胞浸润有所减少，TNF-α（AGL组除外）、IL-1β（AGL组除外）、IL-6（AGH组除外）水平均显著降低，提示AG对DSS诱导的UC炎症反应具有缓解作用。

肠上皮屏障功能障碍与UC的发生发展密切相关，其中由occludin和ZO-1等蛋白组成的紧密连接是肠道上皮屏障的重要组成部分，可防止致病性抗原进入肠腔而引起异常炎症反应，对维持黏膜内微环境平衡具有重要作用[14]。研究指出，当肠上皮屏障功能受损后，肠道防御能力将急速下降，从而导致黏膜结构严重受损，隐窝结构不完整且呈局部轻至重度坏死，杯状细胞大幅减少[15]。本研究结果显示，与CON组比较，UC小鼠结肠黏膜结构严重受损，隐窝结构不完整，其病理学评分显著升高，杯状细胞占比和occludin、ZO-1 mRNA的表达均显著降低或下调；经不同剂量的AG干预后，UC小鼠结肠组织病理损伤均有不同程度改善，AGH组小鼠的病理学评分显著降低，杯状细胞占比和occludin、ZO-1 mRNA的表达均显著升高或上调，提示AG可修复UC小鼠受损的肠上皮屏障。

SIRT1/JNK/p38 MAPK信号通路与炎症性肠道疾病的发生发展密切相关。其中，SIRT1可通过维持细胞连接相关蛋白表达、抑制抗原呈递及促炎趋化因子活化，从而在维持肠上皮屏障完整性中发挥关键作用[16]；作为SIRT1下游关键蛋白，p38 MAPK可通过磷酸化激活下游转录因子，促进IL-1β、TNF-α等炎症因子的分泌，下调occludin、ZO-1蛋白的表达，破坏肠道的紧密连接结构，最终诱发黏膜屏障相关炎症反应[17]；JNK是SIRT1、p38 MAPK的调控蛋白，若抑制其表达可显著延缓结肠炎的进展[18]。本研究结果显示，与CON组比较，UC小鼠结肠组织中SIRT1 mRNA的表达显著下调，JNK、p38 MAPK mRNA的表达均显著上调；经高剂量AG处理后，UC小鼠结肠组织中SIRT1 mRNA的表达显著上调，p38 MAPK mRNA的激活受到明显抑制，表明AG能调节UC相关炎症通路的异常表达，进而阻断结肠炎症反应的进展，但AG对JNK蛋白表达的影响还有待进一步探索。

肠道菌群失衡与肠道炎症反应亢进及肠上皮屏障功能受损密切相关。研究表明，变形菌门菌株会加速肠道炎症病变，是结肠炎小鼠肠道菌群失调的重要标志[19]；大肠埃希菌-志贺氏菌属和肠球菌属菌株作为多种肠道疾病的致病菌，可加剧肠道疾病的进展[20]；而乳杆菌科和双歧杆菌属菌株不仅可帮助宿主肠道降解植物纤维以产生有助于肠道健康的SCFAs，而且可调节肠上皮功能、促进紧密连接的形成[21]。SCFAs是对抗肠道炎症的重要医疗补充剂，其中丁酸是肠上皮细胞的重要能量来源，可通过激活SIRT1的表达和下调TNF-α、IL-1β、p38 MAPK的表达，提高结肠组织中ZO-1、occludin蛋白的表达水平来减轻肠道炎症，从而保护肠内基质[22]。本研究结果显示，与CON组比较，UC小鼠的Chao1、Shannon指数均显著降低，其群落聚类区域明显偏离，Firmicutes/Bacteroidetes和变形菌门的相对丰度均显著升高，粪便样品中乙酸、丁酸的含量均显著降低；经AG干预后，UC小鼠的Chao1、Shannon指数均显著升高，肠道菌群的改变得以扭转，粪便样品中丁酸、丙酸的含量均显著升高。由此可见，AG可能通过改善肠道菌群失衡、调节SCFAs含量、抑制炎症反应进程、修复肠道屏障功能等途径来发挥抗UC作用。

由上述结果可知，AG对肠道菌群及其代谢物的干预效果是明显的，然而这种调节作用是否为该成分改善UC小鼠相关症状的直接原因之一尚未可知。为此，本课题组利用FMT实验进行初步验证。FMT是一种通过将健康个体的粪便移植至微生物失衡的个体中，以协助后者重建微生物平衡的实验方法，已被广泛用于炎症性肠病等与肠道菌群失调密切相关疾病的研究领域[6]。FMT实验结果显示，经DSS处理的粪菌液未能减轻伪无菌UC小鼠的疾病症状，而经AG处理的粪菌液则可减轻伪无菌UC小鼠的相关症状，提示AG对肠道菌群及代谢物的调节作用可能是改善UC小鼠相关症状的原因之一。本课题组通过进一步分析发现，在AG改善作用实验和FMT实验中，AG及其处理的粪菌液均能改善小鼠DAI评分、结肠长度、炎症因子（TNF-α和IL-1β）水平、炎症相关因子（p38 MAPK和SIRT1）mRNA和肠道屏障相关因子（ZO-1）mRNA的表达，其作用机制可能与AG重塑肠道菌群后，部分致病菌代谢物及内毒素对肠道屏障的侵袭破坏环节受阻有关[23]；此外，AG及其处理的粪菌液均可显著影响SIRT1、p38 MAPK mRNA的表达，其作用机制也可能与AG通过调节SCFAs含量来发挥对炎症性肠病小鼠炎症通路的干预作用有关[24—25]。

综上所述，AG可改善UC小鼠的相关症状，减轻其炎症反应和结肠组织病理改变；上述作用可能与调节小鼠肠道菌群多样性，增加丁酸、丙酸含量，促进结肠黏膜屏障的修复，进而调控SIRT1/p38 MAPK炎症通路相关基因表达有关。

参考文献

[1] UNGARO R, MEHANDRU S, ALLEN P B, et al. Ulcerative colitis[J]. Lancet, 2017, 389(10080): 1756-1770.

[2] PARADA VENEGAS D, DE LA FUENTE M K, LANDSKRON G, et al. Short chain fatty acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases[J]. Front Immunol, 2019, 10: 277.

[3] 马祥雪, 温永天, 尹晓岚, 等. 从“脾为之卫”理论探讨肠道黏膜免疫与溃疡性结肠炎的中医机制[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2024, 26(3): 640-645.

[4] TANG E H, LIN H, YANG Y H, et al. Dietary astragalin confers protection against lipopolysaccharide-induced intestinal mucosal barrier damage through mitigating inflammation and modulating intestinal microbiota[J]. Front Nutr, 2024, 11: 1481203.

[5] PENG L, GAO X Y, NIE L, et al. Astragalin attenuates dextran sulfate sodium (DSS)-induced acute experimental colitis by alleviating gut microbiota dysbiosis and inhibiting NF-κB activation in mice[J]. Front Immunol, 2020, 11: 2058.

[6] 宋扬, 温树波. 幼龄犊牛肠道菌群定植及粪菌移植技术的应用[J]. 动物营养学报, 2025, 37(2): 723-734.

[7] 葛俊李, 李芳, 王春霞, 等. 溃疡性结肠炎动物模型的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(11): 165-170, I0040.

[8] GUO J Y, MA B C, WANG Z X, et al. Royal jelly protected against dextran-sulfate-sodium-induced colitis by improving the colonic mucosal barrier and gut microbiota [J]. Nutrients, 2022, 14(10): 2069.

[9] LIU C S, HU Y X, LUO Z Y, et al. Xianglian pill modulates gut microbial production of succinate and induces regulatory T cells to alleviate ulcerative colitis in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 303: 116007.

[10] 杨阳, 周协琛, 李涛, 等. 急性溃疡性结肠炎昆明小鼠模型的制备与评价[J]. 动物医学进展, 2023, 44(2): 72-77.

[11] DONG S J, ZHU M, WANG K, et al. Dihydromyricetin improves DSS-induced colitis in mice via modulation of fecal-bacteria-related bile acid metabolism[J]. Pharmacol Res, 2021, 171: 105767.

[12] KAMINSKY L W, AL-SADI R, MA T Y. IL-1β and the intestinal epithelial tight junction barrier[J]. Front Immunol, 2021, 12: 767456.

[13] AL-SADI R, GUO S H, YE D M, et al. TNF-α modulation of intestinal tight junction permeability is mediated by NIK/IKK-α axis activation of the canonical NF-κB pathway[J]. Am J Pathol, 2016, 186(5): 1151-1165.

[14] KUO W T, ODENWALD M A, TURNER J R, et al. Tight junction proteins occludin and ZO-1 as regulators of epithelial proliferation and survival[J]. Ann N Y Acad Sci, 2022, 1514(1): 21-33.

[15] LIAO W Z, WU H F, PANG L C, et al. *Hylocereus undatus* flower suppresses DSS-induced colitis in mice by reducing intestinal inflammation, repairing the intestinal physical barrier, and modulating gut and lung microbiota [J]. J Funct Foods, 2023, 110: 105820.

[16] WANG L, LI J S, JIANG M S, et al. SIRT1 stabilizes β-TrCP1 to inhibit Snail1 expression in maintaining intestinal epithelial integrity to alleviate colitis[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2024, 18(2): 101354.

[17] FENG Y J, LI Y Y. The role of p38 mitogen-activated protein kinase in the pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. J Dig Dis, 2011, 12(5): 327-332.

[18] KERSTING S, BEHRENDT V, KERSTING J, et al. The impact of JNK inhibitor D-JNKI-1 in a murine model of chronic colitis induced by dextran sulfate sodium[J]. J Inflamm Res, 2013, 6: 71-81.

[19] MUKHOPADHYA I, HANSEN R, EL-OMAR E M, et al. IBD: what role do proteobacteria play?[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2012, 9(4): 219-230.

[20] GOGOKHIA L, BUHRKE K, BELL R, et al. Expansion of bacteriophages is linked to aggravated intestinal inflammation and colitis[J]. Cell Host Microbe, 2019, 25(2): 285-299.e8.

[21] BERGER K, BURLEIGH S, LINDAHL M, et al. Xylooligosaccharides increase *Bifidobacteria* and *Lachnospiraceae* in mice on a high-fat diet, with a concomitant increase in short-chain fatty acids, especially butyric acid[J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(12): 3617-3625.

[22] LIU H, WANG J, HE T, et al. Butyrate: a double-edged sword for health?[J]. Adv Nutr, 2018, 9(1): 21-29.

[23] DI VINCENZO F, DEL GAUDIO A, PETITO V, et al. Gut microbiota, intestinal permeability, and systemic inflammation: a narrative review[J]. Intern Emerg Med, 2024, 19(2): 275-293.

[24] WANG S Q, DENG W L, LI F, et al. Treatment with butyrate alleviates dextran sulfate sodium and *Clostridium difficile*-induced colitis by preventing activity of Th17 cells via regulation of SIRT1/mTOR in mice[J]. J Nutr Biochem, 2023, 111: 109155.

[25] 向小琴. 短链脂肪酸对脂多糖诱导的大鼠急性呼吸窘迫综合征的影响及作用机制[D]. 泸州: 西南医科大学, 2022.

（收稿日期: 2025-01-07　修回日期: 2025-05-17）

（编辑: 张元媛）