

• 实验研究 •

三物白散通过影响 FXR 表达逆转 Th1/Th2 漂移发挥抗肝癌免疫应答作用*

李素素, 濮文渊, 凌云, 马俊杰, 孙松娴, 张静远, 周春祥

南京中医药大学, 江苏 南京 210046

摘要:目的: 探讨三物白散干预肝癌原位移植瘤小鼠 Th1/Th2 细胞因子水平、回肠组织中法尼醇 X 受体(farnesoid X receptor, FXR) 的表达及其和肠道菌群间的关系。方法: 将 ICR 小鼠随机分为 5 组, 即空白组、模型组、三物白散($56.47 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组、万古霉素($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组、消胆胺(2% 消胆胺饲料) 组, 除空白组外, 其余组采用肝内注射 H22 细胞复制肝癌模型, 连续给药 3 周后, HE 染色观察肿瘤细胞病理变化; ELISA 法检测小鼠血清和肝脏组织中白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)、白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 水平; 运用 q-PCR 和 Western Blot 法检测小鼠回肠组织中 FXR 的表达; 通过 16S rRNA 法检测小鼠肠道菌群表达。结果: 与模型组比较, 三物白散组和万古霉素组 Th1 细胞因子 IL-2、TNF- α 和 IFN- γ 水平升高, Th2 细胞因子 IL-4 和 IL-10 水平降低; 回肠组织 FXR 表达降低; 肠道中梭状芽孢杆菌丰度降低。结论: 三物白散可能通过调节肠道菌群结构, 下调回肠组织 FXR 的表达, 逆转 Th1/Th2 漂移, 发挥抗肝癌免疫应答作用。

关键词: 三物白散; 肝癌; 法尼醇 X 受体; 肠道菌群

DOI: 10.16368/j.issn.1674-8999.2021.05.218

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-8999(2021)05-1021-08

Sanwubai Powder Reversing Th1/Th2 Drift by Affecting FXR Expression and Exerting Anti-liver Cancer Immune Response

LI Susu, PU Wenyuan, LING Yun, MA Junjie, SUN Songxian, ZHANG Jingyuan, ZHOU Chunxiang

Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing Jiangsu China 210046

Abstract: Objective: To explore the relationship between the Th1/Th2 cytokine levels, the expression of farnesoid X receptor (FXR) in the ileum tissue and the intestinal flora after the intervention of Sanwubai Powder in mice with orthotopic transplantation of liver cancer. Methods: ICR mice were randomly divided into 5 groups, namely blank group, model group, Sanwubai Powder ($56.47 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, vancomycin ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, cholestyramine (2% cholestyramine feed) group. Except for the blank group, the other groups used intrahepatic injection of H22 cells to replicate the liver cancer model. After continuous administration for 3 weeks, the growth of tumor cells was observed by HE staining. ELISA method is used to detect the levels of interleukin-2 (IL-2), interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ) in mouse serum and liver tissue. Q-PCR and Western Blot methods were used to detect FXR expression in mouse ileum; 16S rRNA technology was used to detect mouse intestinal flora expression. Results: Compared with the model group, the levels of Th1 cytokines IL-2, TNF- α and IFN- γ increased in the Sanwubai Powder group and the vancomycin group, while the levels of Th2 cytokines IL-4 and IL-10 decreased; the expression of FXR in the ileum tissue decreased, and the abundance of Clostridium in the intestinal

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81774021); 江苏省高等学校自然科学研究项目(19KJB360003)

flora decreased. Conclusion: Sanwubai Powder can regulate the structure of intestinal flora ,down-regulate the expression of FXR in ileal tissue ,reverse Th1/Th2 drift and exert an immune response against liver cancer by regulating the structure of intestinal flora.

Key words: Sanwubai Powder; liver cancer; farnesoid X receptor(FXR) ; intestinal flora

肝癌是世界公认的恶性疾病 ,是全球癌症死亡的第三大原因^[1] ,其死亡率居我国消化道恶性肿瘤死亡率之首^[2]。中医无“肝癌”病名 ,但“鼓胀”“癥瘕”“肝积”等与其相似。近年来研究发现^[3] ,肝癌的发生发展和肠道菌群的失调密切相关。中医药可改变肠道微生态环境 ,调节肠道菌群和胆汁酸的异常代谢 ,进而提高机体的免疫力 ,促进抗肿瘤免疫过程^[4]。本课题组前期研究发现 ,三物白散可升高肝癌皮下种植瘤小鼠血清中白细胞介素 - 2(interleukin - 2 ,IL - 2) 、降低白细胞介素 - 4(interleukin - 4 ,IL - 4) 水平 ,逆转 Th1/Th2 漂移 ,改善免疫抑制状态 ,实现肝癌免疫的正向调节作用^[5]。三物白散最早见于《伤寒论》,是温下通腑法的经典方剂 ,方中巴豆通利二便 ,可显著改善肠道菌群结构^[6] ,影响肠道免疫和微生物环境的稳态 ,而法尼醇 X 受体(farnesoid X receptor ,FXR) 是保持肠道免疫和稳态的重要调节因子 ,FXR 的表达和肝癌的发生率有一定相关性 ,FXR 可抑制 IL - 2、肿瘤坏死因子 - α (tumor necrosis factor - α ,TNF - α) 和干扰素 - γ (interferon - gamma ,IFN - γ) 等 Th1 细胞因子的 mRNA 的表达^[7-8]。肠道菌群的变化可引起胆汁酸代谢的改变 ,胆汁酸循环入肝 ,用抗生素和胆汁酸螯合物 - 消胆胺干预肝癌小鼠 ,可引起 Th1 细胞因子对肝癌免疫应答的正向调控^[9-10]。三物白散逆转 Th1/Th2 漂移实现抗肝癌免疫的机制可能与 FXR 的表达、肠道菌群及胆汁酸代谢等因素有关。为证实此推测 ,本研究用三物白散、抗生素和消胆胺作为干预药物 ,观察各组肝癌小鼠血清及肝脏中 Th1/Th2、肠道菌群、回肠中 FXR 表达 ,以期深入探讨三物白散抗肝癌的机制。

1 材料

1.1 动物及细胞 雄性 SPF 级 4 周龄 ICR 小鼠 46 只 ,体质量 18 ~ 22 g ,购于南京市江宁区青龙山动物繁殖场 ,动物许可证号: SCXK(苏) 2017 - 0001 ,合格证号: 201920801 ,伦理批号: 201906A035。小鼠肝癌细胞 H22 细胞(南京拜睿生物科技有限公司 ,货号: BR0661)。

1.2 药物及试剂 三物白散(由巴豆、桔梗、贝母三味药组成 ,安徽药信药业有限公司 ,批号:

20180908) ;消胆胺(南京厚生药业有限公司 ,批号: 190301) ;注射用盐酸万古霉素(浙江医药股份有限公司新昌制药厂 ,批号: 612D021) 。磷酸缓冲液(美国 HyClone 公司 ,批号: AE26543276) ;胎牛血清(杭州四季青公司 ,批号: 11012 - 8611) ;青链霉素混合液(索莱宝公司 ,批号: 20190523) ;DMEM 高糖培养液(美国 HyClone 公司 ,批号: AE29163474) ;苏木精 - 伊红(HE) 染液(广州鸿泉生物科技有限公司 ,批号: HQ6001) ;TNF - α 、IFN - γ 、IL - 2、IL - 4、IL - 10 ELISA 试剂盒(南京金益柏生物科技有限公司 ,批号分别为: JEB - 12474、JEB - 12796、JEB - 12265、JEB - 12266、JEB - 12260) ;Real time PCR Master Mix(SYBR Green) (瑞士 Roche 公司 ,批号: 04913850001) ;TRIzol RNA 试剂(Thermo Fisher scientific 公司 ,批号: 10296028) ;EasyScript First - Strand cDNA Synthesis SuperMix(全式金公司 ,批号: AE301 - 03) ;AceQ Universal SYBR qPCR Master Mix (诺维赞公司 ,批号: Q511 - 02/03) ;PCR 定量试剂盒(美国 Invitrogen 公司 ,批号: P7589) ;琼脂糖(美国 Invitrogen 公司 ,批号: 75510 - 019) ;Osteopontin 抗体(美国 Abcam ,货号: ab214050) ; β - actin 抗体(康为世纪公司 ,货号: CW0097) ;ECL 发光试剂盒(美国 CST 公司 ,批号: 6883S)。

1.3 仪器 Sorvall ST 16R 型高速离心机(美国赛默飞公司) ;荧光显微镜(日本尼康) ;RM2245 型石蜡切片机、HH1220 型烘片机、HH1210 型摊片机、ASP200s 型脱水机、EG1150 型包埋机(德国 Leica 公司) ;BS224 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司) ;DW - 86L626 型 - 86 $^{\circ}$ C 超低温保存箱(海尔医学生物仪器公司) ;Lightcycle 96 realtime - PCR 检测仪(罗氏公司) ;TaKaRa Thermal Cycler PCR 仪(TaKaRa 公司) ;Nano - 100 微量检测仪(杭州奥盛公司) ;Ion S5TMXL 测序系统(美国 Thermo Fisher Scientific 公司) ;超微量分光光度(美国 Thermo Fisher Scientific 公司) DYY - 6B 型稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂) ;印迹转膜系统(北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 药物制备 三物白散: 将巴豆仁打成细粉 ,取适量巴豆粉置于 1 L 圆底烧瓶内 ,加入 2 倍的巴豆

粉体积的石油醚,轻微摇晃使巴豆与石油醚充分混合,采取回流提取法在70℃恒温加热约2h后收集上层溶液,经纱布过滤后使用旋转蒸发仪分离石油醚和巴豆油,收集巴豆油,如此反复加入石油醚提取2次。将经石油醚煎煮后的巴豆渣倒出,平铺于瓷盘内的纱布上,置于通风橱待石油醚挥发殆尽后,转置于50℃干燥箱中彻底烘干。取烘干后巴豆渣再次打粉,过60目网筛后备用,巴豆霜按比例与巴豆油充分混匀。将桔梗、浙贝母饮片分别粉碎,过60目网筛,分装备用。参照《人和动物间按体表面积换算的等效剂量比值表》,将三物白散(成人)换算成小鼠给药浓度,将巴豆霜、浙贝母、桔梗按比例配成三物白散,再加入超纯水配制成三物白散混悬液,浓度为 $5.647\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,给药剂量为 $56.47\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。万古霉素:称取万古霉素药粉,用超纯水溶解,制备成浓度为 $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,置于4℃冰箱备用,给药剂量为 $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。消胆胺饲料:消胆胺药粉和小鼠饲料粗粉按2:100的比例称取,充分混匀,加适量100℃开水搅拌均匀,手工捏成条状,置于50℃烘干箱烘干,备用,即为2%的消胆胺饲料。

2.2 细胞培养 按照悬浮生长细胞的培养方式进行细胞复苏和反复传代,直到收集足够数量的肝癌H22细胞。

2.3 造模分组及给药 取适应性喂养1周后的ICR小鼠40只,根据前期预实验和文献方法进行小鼠肝癌原位移植瘤造模^[11]。将小鼠用1%的戊巴比妥麻醉,取仰卧位,固定于鼠板,常规消毒,用组织剪沿腹中线逐层剪开皮肤,开口长度为1cm,暴露出肝脏。挤出肝脏左外叶,用无菌棉签将肝叶上体液轻轻擦拭干净,取生长良好的H22细胞,离心收集,显微镜下计数约 16×10^7 个,用磷酸缓冲液制备成5mL的细胞混悬液。用1mL注射器吸取0.1mL细胞混悬液,细胞数约为 4×10^6 个,注射器针头与肝左叶成20°左右的角度刺入肝叶内约5mm深,注意不要刺穿肝叶,轻轻推注射器,边推边退出针头,可观察到注射部位的肝叶颜色变灰白,待针头完全退出时用无菌棉签按压针孔15s左右,并滴入组织黏合剂封闭针孔,以防细胞液漏出,待组织黏合剂完全干燥变硬无黏性时缝合关腹,缝合针逐层缝合,无菌棉签擦拭血渍,予以金霉素眼膏涂抹,预防切口感染,小心饲养。

分组:造模成功后随机分为三物白散组、万古霉素组、消胆胺组和模型组,每组10只,空白对照组为6只正常小鼠。三物白散组:正常饲料+饮用超纯

水+三物白散混悬液;抗生素组和消胆胺组给药方法按照文献进行^[9],万古霉素组:正常饲料+饮用超纯水+万古霉素溶液;消胆胺组:2%消胆胺饲料+饮用超纯水+生理盐水;模型组和空白组:正常饲料+饮用超纯水+生理盐水。造模24h后按照上述方式饲养,连续给药21d。

2.4 肿瘤组织病理检查 连续给药21d后,统计小鼠存活数,计算各组小鼠的存活率。颈椎脱臼处死,解剖取肝脏,观察肝脏长瘤情况,并检查有无肿瘤组织块脱落和肿瘤的转移,称其质量、拍照。将肝癌组织浸泡在4%多聚甲醛溶液中,2d后用乙醇脱水,二甲苯透化,石蜡包埋,常规制备病理切片后,镜下观察肝癌组织的病理变化。

2.5 血清因子检测 眼眶取血,低温(4℃)高速离心,取上清液,检测各组小鼠血清中TNF- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10水平。

2.6 肝组织IFN- γ 水平 取肝脏组织,制备肝匀浆,检测其IFN- γ 水平。

2.7 q-PCR法检测回肠组织FXR的表达 运用Trizol法提取RNA^[12-13],提取后检测其纯度。抽提后,稀释RNA,并检测其 $\text{OD}_{260}\cdot\text{OD}_{280}^{-1}$ 的比值,比值为1.8~2.2,即为正常。本操作按照PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)说明书进行逆转录合成cDNA,应用实时荧光定量PCR仪测定FXR转录水平表达。PCR反应步骤如下:95℃变性10min,40个循环:(95℃15s,60℃34s,72℃30s),收集荧光信号,反应结束,进行数据分析,用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算FXR的表达。以GAPDH为内参,引物序列见表1。引物由南京金益柏生物科技有限公司设计合成。

表1 引物序列

基因名称	序列	片段长度
GAPDH	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG	153 bp
	ATGCCAGTGAAGCTTCCCGTTCAG	
FXR	GGGATGAGTGTGAAGCCAGCTA	124 bp
	GTGGCTGAAGTGAAGAAACGG	

2.8 Western blot法检测小鼠回肠组织中FXR的表达 小鼠的回肠组织用1mL的RIPA缓冲液匀浆取上清,NanoDrop测定蛋白含量。经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,转移到PVDF膜上,用含5%脱脂奶粉PBST封闭1h;一抗4℃孵育过夜,PBST漂洗3次,每次5min;二抗室温孵育1h,PBST漂洗3次,每次5min;加入ECL发光液,在化学发光成像仪成像后进行灰度值分析。

2.9 肠道菌群的测序 小鼠处死当天,收集回盲部肠道内容物,置于冻存管中,-80℃超低温冰箱备用。提取肠道菌群总DNA,用赛默飞公司的Ion S5TMXL上机测序。下机整理数据,完成测序数据生物信息学分析,进行肠道菌群丰度和多样性分析。

2.10 统计学方法 运用SPSS 22.0软件对数据进行分析,实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用One-way ANOVA分析,组间两两比较采用t检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

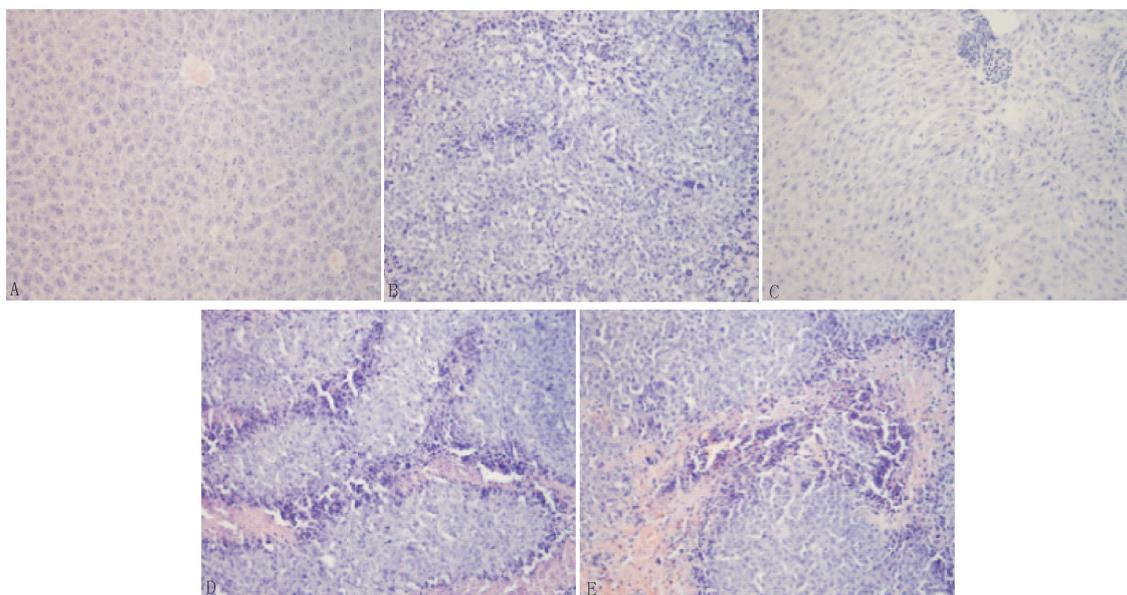
3 结果

3.1 小鼠的死亡数量 空白组小鼠未出现死亡和腹水;模型组小鼠有5只腹水,死亡4只;消胆胺组

小鼠4只腹水,死亡2只;三物白散组小鼠1只腹水,无死亡;万古霉素组小鼠2只腹水,无死亡。

3.2 小鼠肝癌组织的病理结果 空白组为正常肝组织切片;模型组有大量炎症浸润性细胞,中心坏死并形成大量空洞;三物白散组仅有极少量的癌性炎症细胞浸润;万古霉素组和消胆胺组有大量炎症浸润的细胞,坏死性空洞较少。见图1。

3.3 对小鼠血清Th1细胞因子的影响 与空白组比较,模型组血清IL-2、TNF- α 、IFN- γ 的水平明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,三物白散组中IL-2、TNF- α 、IFN- γ 水平显著升高($P < 0.01$),万古霉素组IL-2水平显著升高($P < 0.01$),消胆胺组TNF- α 水平显著升高($P < 0.01$)。见表2。



注: A: 空白组; B: 模型组; C: 三物白散组; D: 万古霉素组; E: 消胆胺组

图1 各组小鼠肝癌组织HE染色结果(HE, $\times 200$)

表2 对小鼠血清Th1细胞因子的影响 ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

组别	n	IL-2	TNF- α	IFN- γ
空白组	6	1 949.24 \pm 65.98	350.42 \pm 25.38	647.34 \pm 80.37
模型组	6	2 036.48 \pm 80.30*	389.85 \pm 9.96*	717.11 \pm 71.41*
三物白散组	6	2 438.71 \pm 63.18 ^{##$\Delta\Delta$}	504.91 \pm 20.73 ^{##$\Delta\Delta$}	858.84 \pm 60.81 ^{##$\Delta\Delta$}
消胆胺组	6	2 095.07 \pm 53.21	442.48 \pm 60.57 ^{##}	722.36 \pm 35.58
万古霉素组	6	2 229.66 \pm 86.79 ^{##$\Delta\Delta$}	407.20 \pm 21.83	769.48 \pm 30.48

注: 与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,## $P < 0.01$;与消胆胺组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$

3.4 对小鼠血清Th2细胞因子(IL-4、IL-10)的影响 与空白组比较,模型组血清IL-4水平明显升高($P < 0.05$),IL-10水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,三物白散、万古霉素、消胆胺均可降

低IL-4、IL-10的水平($P < 0.05$; $P < 0.01$);而三物白散和万古霉素效果优于消胆胺。见表3。

表3 对小鼠血清Th2细胞因子的影响 ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

组别	n	IL-4	IL-10
空白组	6	111.23 \pm 13.64	652.39 \pm 22.93
模型组	6	262.96 \pm 17.22*	932.38 \pm 37.43**
三物白散组	6	153.25 \pm 13.36 ^{##$\Delta\Delta$}	698.96 \pm 20.95 ^{##$\Delta\Delta$}
消胆胺组	6	194.05 \pm 12.08 [#]	819.07 \pm 48.09 [#]
万古霉素组	6	162.52 \pm 15.22 ^{##$\Delta\Delta$}	750.45 \pm 46.28 ^{##$\Delta\Delta$}

注: 与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与消胆胺组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

3.5 对小鼠肝脏组织IFN- γ 水平的影响 与空白组比较,模型组肝脏组织中IFN- γ 水平明显升

高($P < 0.05$);与模型组比较,万古霉素和三物白散组均可升高IFN- γ 的水平($P < 0.05$; $P < 0.01$)。见表4。

表4 对小鼠肝脏组织IFN- γ 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IFN- γ ($\rho/\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)
空白组	6	1 123.75 \pm 84.93
模型组	6	1 229.79 \pm 74.93*
三物白散组	6	1 369.85 \pm 42.98##
消胆胺组	6	1 240.11 \pm 111.84
万古霉素组	6	1 316.47 \pm 48.51#

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$

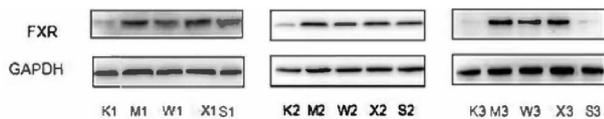
3.6 对小鼠回肠组织FXR mRNA表达的影响
运用q-PCR法检测各组小鼠回肠组织内FXR mRNA的表达。与空白组比较,模型组小鼠回肠组织中FXR mRNA表达显著增高($P < 0.01$);与模型组比较,三物白散组和万古霉素组FXR mRNA的表达降低($P < 0.05$),消胆胺组FXR mRNA表达升高($P < 0.01$)。见表5。

表5 对小鼠回肠组织FXR mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FXR mRNA
空白组	6	0.90 \pm 0.04
模型组	6	1.94 \pm 0.03*
三物白散组	6	1.38 \pm 0.01#
万古霉素组	6	1.44 \pm 0.10#
消胆胺组	6	2.51 \pm 0.13 Δ

注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$, $\Delta P < 0.01$

3.7 Western Blot法测定小鼠回肠组织中FXR的表达
与空白组相比,模型组小鼠回肠组织中FXR的表达显著升高($P < 0.01$);与模型组相比,三物白散组和万古霉素组FXR表达明显降低($P < 0.05$),消胆胺组FXR表达有降低的趋势($P > 0.05$)。见表6和图2。



注:K:空白组;M:模型组;S:三物白散组;W:万古霉素组;X:消胆胺组

图2 Western Blot法测定小鼠回肠组织中FXR的表达

3.8 肠道菌群测序

3.8.1 各组小鼠肠道菌群丰度及多样性分析
与空白组比较,模型组菌群丰度(*Chao1*)指数降低、香农(*Shannon*)指数增高($P < 0.05$);与模型组比较,

三物白散组肠道菌群*Chao1*、*Shanno*指数有降低的趋势($P > 0.05$),消胆胺组菌群*Chao1*、*Shanno*指数明显增加($P < 0.05$),万古霉素组可明显降低*Chao1*、*Shanno*指数($P < 0.05$)。见表7。

表6 小鼠回肠组织中FXR蛋白表达相对

灰度值分析 ($\bar{x} \pm s$)		
组别	n	FXR/GAPDH
空白组	3	0.85 \pm 0.26
模型组	3	2.63 \pm 0.21**
三物白散组	3	1.44 \pm 0.37 Δ
万古霉素组	3	1.36 \pm 0.25 Δ
消胆胺组	3	2.50 \pm 0.15

注:与空白组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$;与消胆胺比较, $\Delta P < 0.05$

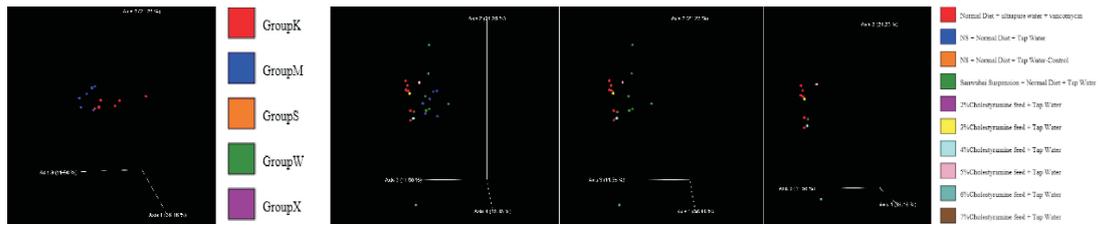
表7 肠道菌群丰度和多样性分析 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	菌群丰度	香农指数
空白组	6	237.33 \pm 25.01	5.903 7 \pm 0.782 0
模型组	6	208.44 \pm 27.49*	5.474 7 \pm 0.119 2*
三物白散组	6	202.11 \pm 32.90	5.373 8 \pm 0.873 3
消胆胺组	6	279.09 \pm 14.88#	5.815 3 \pm 0.967 9#
万古霉素组	6	184.51 \pm 8.60#	4.313 6 \pm 0.320 3##

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$

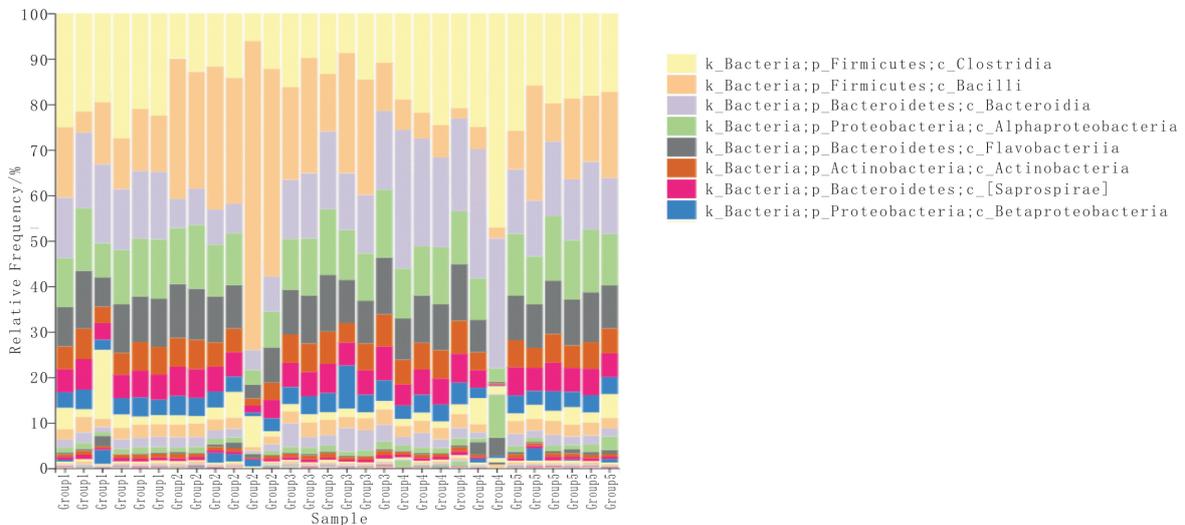
3.8.2 用Bray Curtis距离计算差异度分析
使用Bray Curtis距离计算差异度分析,Bray Curtis距离值在0~1之间,数值接近0时表示菌群组成和丰度一致,组间无差异或差异不显著,数值越大表示组间样品的差异越大。与空白组变焦,模型组菌群有差异,与模型组比较,三物白散差异不显著,万古霉素和消胆胺组差异明显。见图3。

3.8.3 小鼠肠道菌群在纲水平上的分布情况
为进一步明确小鼠肠道菌群的物种组成,将OTU代表序列与数据库对比分析,发现主要为以下4种菌门构成:厚壁菌门(*Firmicute*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)。其中大多数菌门都集中在厚壁菌门、拟杆菌门和变形菌门。在纲水平中,与空白组比较,模型组梭状芽孢杆菌纲(*Clostridia*)丰度增加;与模型组比较,三物白散组梭状芽孢杆菌和拟杆菌纲(*Bacteroidia*)丰度明显减少($P < 0.05$),万古霉素组梭状芽孢杆菌丰度明显减少($P < 0.05$),消胆胺组梭状芽孢杆菌纲和拟杆菌纲丰度显著增加($P < 0.01$)。见图4。



注: GroupK: 空白组 ,GroupM: 模型组 ,GroupS: 三物白散组 ,GroupW: 万古霉素组 ,GroupX: 消胆胺组

图3 bray curtis 距离计算差异度分析



注: Group1: 模型组 ,Group2: 三物白散组 ,Group3: 万古霉素组 ,Group4: 消胆胺组 ,Group5: 空白组

图4 纲类水平物种构成柱状图

4 讨论

《素问·阴阳应象大论》有“阳化气阴成形”之论,阳主动、主散,化气作用是阳的特性,阴主静、主凝,成形是阴的特性。阳化气阴成形是自然万物生化及人体物质代谢的基本活动形式,自然界万物的生化,人体生理活动的新陈代谢,都可概括为“阳化气,阴成形”^[14]。在病理上,形成肿瘤的本质原因是机体阳气受损化气不及而阴成形太过^[15]。现代研究表明^[16],中医药可改变消化道肿瘤中肠道菌群结构,提高肿瘤患者免疫功能。三物白散原方由巴豆、桔梗、贝母三药组成。巴豆性辛温,可化寒凝之形,将有形之物推出体外,攻邪外出^[17]。其可调整小肠传输功能紊乱,降低肠黏膜通透性,防止肠腔内发生细菌或病毒移位,抑制肠道致病菌群生长^[18-19]。桔梗中的桔梗皂苷具有抗肿瘤、保肝、抗病毒等药理作用,且桔梗皂苷D、桔梗皂苷D3和远志皂苷均可抑制人肝癌 Bel-7402 细胞株的增殖,但口服绝对生物利用度低,很难被肠道直接吸收,因而可能作为一种益生元,增加有益菌的数量和比例,通过改善肠道

内环境,平衡紊乱的菌群,促进机体康复^[20-21]。目前已经证实^[22],三物白散体外可杀伤肿瘤细胞、调节肿瘤细胞增殖周期进而促进肿瘤细胞凋亡、有效抑制肿瘤细胞增殖、下调肿瘤细胞释放相关免疫抑制因子、降低肿瘤相关基因的表达率、拮抗细胞多药耐药性、防止肿瘤的复发和转移。

肝脏大约 70% 的血液供应来源于门静脉,门静脉包含了大量胃肠道的代谢物、微生物抗原和菌群代谢产物。菌群代谢产物可影响肝脏新陈代谢,参与调控肝脏氧化、细胞因子、肝内毒素和胆汁酸的产生等代谢过程,肝脏细胞因子、肝内毒素、胆汁酸又可进一步调节肠道菌群代谢。肠肝循环将肠道微生物和肝脏在生理和病理上紧密相连,肠道菌群失调会影响肝脏的生理病理^[23-25]。研究发现^[9-10],用抗生素处理肝癌小鼠肠道菌群,可中断肠道菌群介导的胆汁酸代谢过程,最终使 NKT(natural killer T) 细胞在肝脏中大量聚集,产生抗肿瘤作用的 Th1 细胞因子 IFN- γ ,从而抑制肝癌的发生发展。此外,NKT 细胞可通过清除衰老和变形的肝细胞、抑制肝癌细胞生长等发挥抗肝癌免疫应答^[26],而服用益生

菌、益生元、采取粪便微生物移植等干预肠道微生物的措施有改善和治疗慢性肝病和肝癌的潜力^[27]。三物白散之巴豆、桔梗可调节紊乱的肠道菌群,用药后会影响到肝癌小鼠肠道菌群结构和丰度,而肠道菌群变化会影响胆汁酸代谢。前期研究证实,三物白散可有效提高肝癌小鼠 Th1 细胞因子表达,而胆汁酸代谢、Th1 细胞因子表达与 FXR 表达密切相关。三物白散逆转 Th1/Th2 漂移发挥正向免疫应答的更深层机制是否通过调节肠道菌群,调控 FXR 表达,介导胆汁酸代谢,升高 Th1 细胞因子水平是本实验探讨的问题。

本实验通过对肝癌小鼠模型腹水率、死亡率、肠道菌群、细胞因子(IL-2、IL-4、IL-10、TNF- α 和IFN- γ)、FXR 等指标的检测,探讨三物白散逆转 Th1/Th2 漂移发挥正向调节肝癌免疫应答的更深层机制。与模型组比较,三物白散组和万古霉素组回肠组织中 FXR 表达受抑制, Th1 因子水平升高、Th2 因子水平降低,腹水率和死亡率亦低于模型组,FXR 表达和 Th1 表达呈负相关, Th2 表达呈正相关。消胆胺组 FXR 表达增加,在调节细胞因子、降低死亡率和腹水率方面,效果不佳,提示三物白散可能通过抑制小鼠回肠组织中 FXR 的表达,进而提高 Th1 水平,抑制 Th2 表达,逆转 Th1/Th2 漂移,发挥免疫正向调节作用,肝癌小鼠腹水率低,存活率高。三物白散抑制 FXR 表达的作用可能与其改变肠道菌群结构有关。与模型组比较,三物白散组肠道菌群丰度和多样性改变不明显,可能与巴豆泻下作用加快肠道菌群代谢产物的排泄,减少菌群多样性有关,但不影响其发挥肝癌正向免疫调节功能。万古霉素组肠道菌群丰度和多样性均有不同程度地减少,因抗生素可直接杀死肠道内微生物。三物白散组和万古霉素组在纲水平的梭状芽孢杆菌纲(*Clostridia*)和拟杆菌纲(*Bacteroides*)丰度降低,消胆胺组梭状芽孢杆菌纲和拟杆菌纲丰度增高。三物白散对肠道菌群丰度和多样性改善不明显,但改变了菌群结构,梭状芽孢杆菌丰度降低。肝脏中合成初级胆汁酸,分泌到肠道后在肠道菌群作用下转变为次级胆汁酸,不仅调节脂质的消化吸收,还可调节 FXR 活性及其下游通路,某些药物可通过调控肠道菌群影响胆汁酸组成,进而影响 FXR 的活性^[28]。梭状芽孢杆菌是调节胆汁酸代谢的重要菌群。研究表明,梭状芽孢杆菌可

介导 7α -脱羟基反应,使初级胆汁酸转变为次级胆汁酸,次级胆汁酸经肠肝循环(门静脉)入肝,在肝脏中发生一系列病理反应,最终介导肝癌的发展。给予肝癌小鼠抗生素治疗后,肠道中梭状芽孢杆菌被杀死,中断了 7α -脱羟基反应,循环入肝的胆汁酸为初级胆汁酸,最终发挥抗肝癌免疫应答^[9-10]。由此推测,三物白散可调节肠道菌群的梭状芽孢杆菌介导胆汁酸代谢,干预 FXR 的表达,逆转 Th1/Th2 漂移,实现肝癌免疫应答的正向调节。为证明此推测,需进一步实验研究初级胆汁酸、次级胆汁酸和 FXR 活性、表达之间的相关性。万古霉素可直接作用于肠道杀死梭状芽孢杆菌;消胆胺是胆汁酸螯合物,可加速肠道胆汁酸排出体外,FXR 表达增加,但未明显抑制 Th1 和促进 Th2 细胞因子表达,可能与消胆胺提高肠道菌群丰度和增加拟杆菌丰度有关。有研究表明,FXR 表达有一定抑制肿瘤增长的作用,而本实验却呈现相反的结果,可能是肿瘤的发生发展及免疫应答反应不是简单的点与点、线与线,甚至面与面的关系,常常涉及多系统、多脏器、多因素,FXR 的表达和肝癌免疫应答受到多层因素影响,因而不能准确地表达其相关性。此外,三物白散降低梭状芽孢杆菌丰度是直接作用于肠道杀死梭状芽孢杆菌或是加速梭状芽孢杆菌排出体外尚未明确,还有待进一步实验验证。

参考文献:

- [1] BERTINO G, DEMMA S, ARDIRI A, et al. The immune system in hepatocellular carcinoma and potential new immunotherapeutic strategies[J]. Biomed Res Int 2015; 731469.
- [2] 李木松, 张贵贤, 陈晖, 等. 加味茵陈蒿汤抑制人肝癌裸鼠皮下移植瘤生长的机制[J]. 中医学报 2020, 35(5): 1059-1064.
- [3] EZZAIDI N, ZHANG X, COKER O O, et al. New insights and therapeutic implication of gut microbiota in non-alcoholic fatty liver disease and its associated liver cancer[J]. Cancer Lett, 2019, 459: 186-191.
- [4] 濮文渊, 汪志霞, 周春祥, 等. 肠道微生态与中医药抗肿瘤机制的相关性探讨[J]. 中医杂志 2019, 60(3): 210-213.
- [5] 刘红艳. 三物白散逆转荷瘤机体 Th1/Th2 漂移及其作用机制研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2005.
- [6] 李瑶, 郭盛, 陶伟伟, 等. 基于利尿作用及肠道菌群结构的巴豆霜与甘草配伍禁忌机制研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(3): 518-525.
- [7] VAVASSORI P, MENCARELLI A, RENGA B, et al. The bile acid receptor FXR is a modulator of intestinal innate immunity[J]. J Immu-

- nol 2009 ,183(10) : 6251 – 6261.
- [8] STOJANCEVIC M ,STANKOV K ,MIKOV M. The impact of farnesoid X receptor activation on intestinal permeability in inflammatory bowel disease[J]. *J Can De Gastroenterol* 2012 ,26(9) : 631 – 637.
- [9] MA C ,HAN M J ,HEINRICH B ,et al. Gut microbiome – mediated bile acid metabolism regulates liver cancer via NKT cells [J]. *Science* 2018 ,360(6391) : 5931.
- [10] SCHRAMM C. Bile acids ,the microbiome ,immunity ,and liver tumors [J]. *N Engl J Med* 2018 ,379(9) : 888 – 890.
- [11] 赵方 ,胡明道 ,陈鹏. 小鼠肝癌原位移植模型的建立及其研究意义 [J]. *现代肿瘤医学* 2017 ,25(18) : 2883 – 2885.
- [12] HAIMOV – KOCHMAN R ,FISHER S J ,WINN V D. Modification of the standard Trizol – based technique improves the integrity of RNA isolated from RNase – rich placental tissue [J]. *Clin Chem* ,2006 ,52(1) : 159 – 160.
- [13] CONNOLLY M A ,CLAUSEN P A ,LAZAR J G. Purification of RNA from animal cells using trizol [J]. *CSH Protoc* ,2006 ,2006(1) : 4104.
- [14] 丁井永 ,郑瑾 ,任秦有 ,等. 试论“阳化气 ,阴成形”与老年肿瘤 [J]. *中医学报* 2012 ,27(11) : 1394 – 1395.
- [15] 孟春芹 ,王瑞平. “阳化气 ,阴成形”与中医肿瘤关系探究 [J]. *长春中医药大学学报* 2016 ,32(6) : 1174 – 1176.
- [16] 张玉星 ,朱凯 ,俞仲贤 ,等. 益气养阴方对胃肠道肿瘤化疗后患者肠道菌群及免疫功能的影响 [J]. *中医学报* ,2021 ,36(1) : 176 – 181.
- [17] 臧云彩 ,谢秋利 ,杨伟超. 巴豆及其应用 [J]. *中医学报* 2018 ,33(5) : 805 – 808.
- [18] 王晓红. 大黄、巴豆霜对溃疡性结肠炎大鼠药效机制及有效物质基础的探讨 [D]. 天津: 天津医科大学 2012.
- [19] 徐飞 ,宋晶晶 ,孟旭芳 ,等. 巴豆炭结肠灌注治疗放射性肠炎个案报道 [J]. *世界最新医学信息文摘* 2018 ,18(31) : 177.
- [20] 李伟 ,齐云 ,王梓 ,等. 桔梗皂苷体外抗肿瘤活性研究 [J]. *中药药理与临床* 2009 ,25(2) : 37 – 40.
- [21] 王娟. 桔梗皂苷 D 的药代动力学研究 [D]. 南京: 南京中医药大学 2012.
- [22] 濮文渊 ,孙松娴 ,凌云 ,等. 《伤寒论》三物白散抗肿瘤作用研究进展 [J]. *中华中医药杂志* 2017 ,32(1) : 225 – 227.
- [23] JIANG J W ,CHEN X H ,REN Z G ,et al. Gut microbial dysbiosis associates hepatocellular carcinoma via the gut – liver axis [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2019 ,18(1) : 19 – 27.
- [24] YU L X ,SCHWABE R F. The gut microbiome and liver cancer: mechanisms and clinical translation [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017 ,14(9) : 527 – 539.
- [25] 王飞雪 ,于君. 肠道菌群与原发性肝癌 [J]. *实用肝脏病杂志* ,2020 ,23(6) : 769 – 772.
- [26] 李素素 ,周春祥. NKT 细胞对肝癌免疫应答的双向调控作用 [J]. *实用肿瘤学杂志* 2019 ,33(6) : 540 – 543.
- [27] 冯锦凯 ,陈振华 ,武宇轩 ,等. 肠道菌群在慢性肝病和肝细胞癌中的作用及临床意义 [J]. *第二军医大学学报* 2020 ,41(11) : 1246 – 1249.
- [28] 邹步 ,唐莹 ,杨文玲 ,等. 肠道菌群 – FXR 轴在代谢性疾病中的作用 [J]. *中国病理生理杂志* 2019 ,35(9) : 1716 – 1720.

收稿日期: 2020 – 12 – 28

作者简介: 李素素(1992 –) ,女 ,河南驻马店人 ,硕士研究生 ,主要从事伤寒论方药抗炎、抗肿瘤机制的研究。

通信作者: 周春祥(1964 –) ,男 ,江苏扬州人 ,医学博士 ,主任医师 ,教授 ,博士生导师 ,主要从事伤寒方药抗炎抗肿瘤机制的研究。E – mail: chunxiangzhou@ hotmail. com

编辑: 李艳