

· 基础研究 ·

寒凝血瘀状态对子宫内膜异位症小鼠肠道菌群结构的影响

倪喆鑫 毕艳丽 孙 帅 俞超芹

摘要 **目的** 观察寒凝血瘀状态对子宫内膜异位症 C57BL/6 小鼠肠道菌群结构和腹腔内脂多糖 (LPS) 含量的影响。**方法** 采用随机数字表法将小鼠随机分为空白对照组 (空白组), 寒凝血瘀模型组 (寒瘀组), 内异症模型组 (内异症组), 寒凝血瘀型内异症复合模型组 (复合模型组), 每组 5 只并分别进行造模。采用 16S 核糖体基因测序法对小鼠粪便样本进行分析。小鼠 LPS 酶联免疫试剂盒检测小鼠腹腔灌洗液中 LPS 浓度。**结果** 与内异症组比较, 复合模型组小鼠肠道菌群中放线菌门等 4 种菌门及乳杆菌属等 2 种菌属丰度显著增加 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 而拟杆菌门及拟杆菌目 S24-7 组等 4 种菌属丰度显著降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。复合模型组小鼠腹腔灌洗液中 LPS 浓度显著高于空白组与寒瘀组 ($P < 0.05$), 亦高于内异症组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 寒凝血瘀状态能够改变正常小鼠和内异症小鼠肠道菌群结构, 并影响小鼠腹腔内 LPS 浓度。

关键词 寒凝血瘀; 子宫内膜异位症; 动物模型; 肠道菌群; 脂多糖

Effect of Blood Stasis Caused by Cold on the Gut Microbiota of Endometriosis Mice NI Zhe-xin, BI Yan-li, SUN Shuai, and YU Chao-qin Department of TCM Gynecology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai (200433)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of blood stasis caused by cold on the gut microbiota and lipopolysaccharides (LPS) content in abdominal cavity of C57BL/6 mice with endometriosis (EM). **Methods** The mice were randomly divided into the blank control group, blood stasis caused by cold model group, EM model group, and blood stasis caused by cold with EM model group. Five in each group and modeling was performed. 16S ribosomal gene sequencing was used to analyze the stool samples of mice. The concentration of LPS in peritoneal lavage fluid of mice was detected by ELISA. **Results** Compared with EM model mice, the abundance of gut microbiota at phylum level such as *Actinobacteria* and genus level such as *Lactobacillus* in blood stasis caused by cold with EM model mice increased significantly ($P < 0.01$, $P < 0.05$), while the abundance of gut microbiota at phylum level such as *Bacteroidetes* and genus level such as *Bacteroidales* S24-7 group decreased significantly ($P < 0.01$, $P < 0.05$). LPS concentration in peritoneal lavage fluid of the blood stasis caused by cold with EM model group was significantly higher than that of the blank control group and blood stasis caused by cold model group ($P < 0.05$), and higher than that of EM model group ($P > 0.05$). **Conclusion** Blood stasis caused by cold changed the structure of gut microbiota in normal mice and EM mice, and affected LPS concentrations in abdominal cavity of mice.

KEYWORDS blood stasis caused by cold; endometriosis; mouse model; gut microbiota; lipopolysaccharide

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81573755; No. 81503604; No. 81774352; No. 81703874); 上海市中医药三年行动计划 [No. ZY(2018-2020)-FWTX-1107]

作者单位: 海军军医大学附属长海医院中医妇科 (上海 200433)

通讯作者: 俞超芹, Tel: 021-31161959, Email: chqyu81@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20190905.284

子宫内膜异位症(简称内异症)是一种女性常见疾病,是由于子宫内膜基质细胞与腺体在子宫被覆黏膜及子宫肌层以外部位种植生长导致^[1,2]。寒凝血瘀是内异症患者的常见证型,主要与饮冷受凉,体阳受损,从而导致气血运行失调有关,与痛经、月经紊乱、局部囊肿、不孕等症状的出现密切相关^[3,4]。肠道菌群寄生于人体肠道内,对人体代谢、免疫、神经等功能有着重要影响,与多种疾病的发生发展密切相关^[5]。本实验引入寒凝血瘀型子宫内膜异位症小鼠模型,观察寒凝血瘀状态对内异症小鼠肠道菌群结构以及腹腔内脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)浓度影响,以期为子宫内膜异位症的研究提供新思路。

材料与方法

1 动物及分组 25 只 6 周龄健康雌性 C57BL/6 小鼠,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0006。采用随机数字表法分为空白对照组(简称空白组),寒凝血瘀模型组(简称寒瘀组),内异症模型组(简称内异症组),寒凝血瘀型内异症复合模型组(简称复合模型组),每组 5 只,供体鼠 5 只。于海军军医大学附属长海医院动物中心 SPF 条件下饲养,12 h 光照,12 h 黑暗,每周更换 1 次敷料,24 h 自由食用无菌营养颗粒饲料与无菌水。所有实验操作均严格遵照海军军医大学附属长海医院实验动物中心指南执行,遵守动物保护、动物福利和伦理原则及相关规定。

2 药物 苯甲酸 β -雌二醇由美国 Sigma-Aldrich 公司提供,实验用芝麻油由美国 Acros organics 公司提供。

3 试剂与仪器 氯化钠注射液,中国大冢制药有限公司产品;75%医用消毒酒精,杭州欧拓普生物技术有限公司产品;小鼠 LPS 酶联免疫试剂盒,美国 CUSABIO 公司产品;DNA 提取试剂盒,美国 Omega Bio-Tek 公司产品;DNA 凝胶提取试剂盒,美国 Axygen Biosciences 公司产品;2%琼脂糖凝胶,西班牙 Biowest 公司产品;FastPfu 聚合酶,中国 TransGen 公司产品;DNA 提取试剂盒,美国 MP 公司产品。移液器(型号:Eppendorf N13462C)、小型离心机(型号:Eppendorf 5430 R)和高速台式冷冻离心机(型号:Eppendorf 5424R)均,德国 Eppendorf 公司产品;超微量分光光度计(型号:NanoDrop2000),美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品;电泳仪(型号:DYY-6C),中国北京市六一仪器厂产品;PCR 仪(型号:ABI GeneAmp 9700 型),美国 ABI 公司产品;

DNA 定量检测仪(型号:QuantiFluor-ST),美国 Promega 公司产品;MISEQ 测序仪(型号:Illumina Miseq)和 HISEQ 测序仪(型号:Illumina hiseq)均为美国 Illumina 公司产品;酶标仪(型号:BioTek ELx800),美国 Biotek 公司产品;微型荧光计(型号:M220),为中国 Gene Company Limited 公司产品;旋涡混合器(型号:QL-901),由中国海门其林贝尔仪器制造有限公司产品;粉碎研磨仪(型号:TL-48R),中国上海万柏生物科技有限公司产品;剪刀、镊子、1.5 mL EP 管,均由上海长海医院动物中心提供。

4 方法

4.1 内异症小鼠模型构建 参照参考文献[6],将小鼠于动物中心适应 2 周。第 1、4、7 天皮下注射 0.2 mL 雌激素溶液,第 8 天行子宫内膜碎片移植。将供体鼠脱颈处死后,75%酒精浸泡 3 min,解剖获得子宫。沿子宫纵轴剖开并剪碎为 1 mm \times 1 mm \times 1 mm 大小碎片后,用 20 mL 注射器吸取内膜碎片,按供体鼠与受体鼠以 1:2 的比例进行腹腔注射移植。移植后当天及造模的第 11、14 天皮下注射 0.2 mL 雌激素溶液。小鼠自然生长 3 周后进行解剖与标本收集,腹腔内可见明显内异病灶,提示造模成功(图 1)。内膜移植过程尽可能在无菌条件下进行。实验过程中无小鼠死亡。

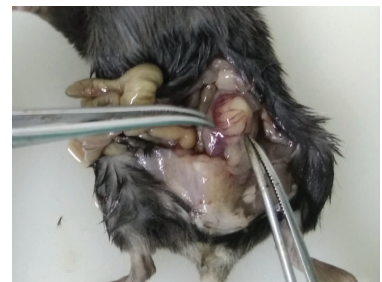


图 1 内异症小鼠腹腔内病灶

4.2 寒凝血瘀小鼠模型以及复合模型构建 小鼠于动物中心适应 1 周,每天下午固定时间将小鼠行冷水浴,水温 0~4 $^{\circ}$ C,持续时间 6 min,连续 1 周,可见小鼠耳廓血流减缓,爪甲颜色转为青紫,提示寒凝血瘀模型小鼠构建成功^[7]。复合模型小鼠在寒凝血瘀模型基础上行内异症造模构建。

4.3 小鼠腹腔灌洗液获取 小鼠自然生长 3 周后,予脱颈处死,75%酒精浸泡 3 min。取出后用 5 mL 注射器吸取无菌生理盐水 2 mL 行腹腔注射。轻柔小鼠腹部 1 min,用剪镊剥除小鼠腹部局部皮毛,露出腹壁后剪开一小口,用注射器吸取腹腔灌洗液 1.5 mL/只,于 4 $^{\circ}$ C 条件下,1 300 r/min,离心 6 min。去沉淀取上清,置于 -80 $^{\circ}$ C 保存。根据 LPS 酶联免疫试剂盒说

说明书对小鼠腹腔灌洗液上清行 LPS 浓度检测。

4.4 粪便样本获取与测序 在获取腹腔灌洗液后,用剪刀剪取小鼠盲肠段,用镊子将盲肠中粪便挤出置于 1.5 mL EP 管中。每只小鼠获取 3~4 粒粪便,置于 -80 °C 保存。根据 DNA 提取试剂盒说明书进行样本总 DNA 抽提,利用 NanoDrop2000 对抽提的 DNA 浓度和纯度进行检测;用 338F (5'-ACTC-CTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGAC-TACHVGGGTWTCTAAT-3') 引物对细菌 16sRNA 的 V3~V4 可变区进行 PCR 扩增。使用 2% 琼脂糖凝胶回收 PCR 产物,利用 DNA 凝胶提取试剂盒进行纯化,2% 琼脂糖电泳检测。利用 DNA 定量检测仪进行定量检测。根据 Illumina MiSeq 平台标准操作规程将纯化后的扩增片段构建 PE 2 × 300 文库,并利用 MiSeq 平台进行测序。原始测序序列使用 Trimmomatic 软件质控,使用 FLASH 软件进行拼接。使用 Usearch 软件 (version 7.0 <http://drive5.com/uparse/>),根据 97% 的相似度对序列进行 OTU 聚类,并在聚类的过程中去除单序列和嵌合体。利用 RDP classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/>) 对聚类后的代表序列进行物种分类注释,比对 Silva 数据库 (SSU128/16s bacteria),设置比对阈值为 70%。利用 R 语言工具作图绘制群落 Bar 图,从而得知不同分组在门和属水平上的群落结构组成情况。

4.5 统计学方法 应用 SPSS 21.0 统计软件进行分析,采用 *kruskal-Wallis* 秩和检验对 4 组之间肠道菌群丰度差异进行比较后,进一步采用 *Wilcoxon* 秩和检验进行两组之间肠道菌群丰度差异比较;两组间腹腔灌洗液 LPS 浓度差异比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组肠道菌群门水平比较(图 2、3) 4 组小鼠肠道菌群门水平进行比较,厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门、放线菌门、螺旋体菌门、柔膜菌门、脱铁杆菌门和未分类菌门差异有统计学意义($P < 0.05$);与空白组比较,寒瘀组小鼠肠道菌群中的厚壁菌门、放线菌门、螺旋体菌门、柔膜菌门、脱铁杆菌门和未分类菌门丰度显著增加,而拟杆菌门和变形菌门丰度显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.01, P < 0.05$)。与内异症组比较,复合模型组小鼠肠道菌群中的放线菌门、螺旋体菌门、脱铁杆菌门及未分类菌门丰度显著增加,而拟杆菌门丰度显著降低 ($P < 0.01, P < 0.05$)。

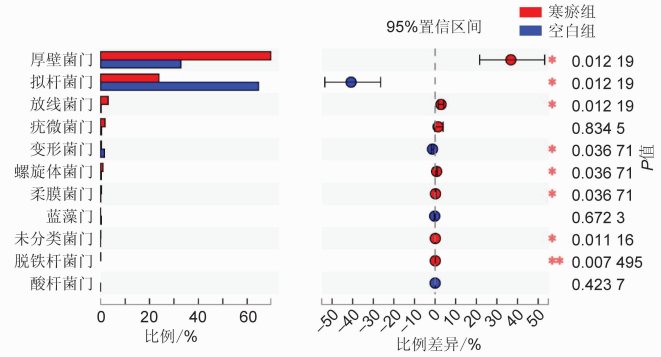


图 2 空白组与寒瘀组小鼠肠道菌群门水平丰度比较

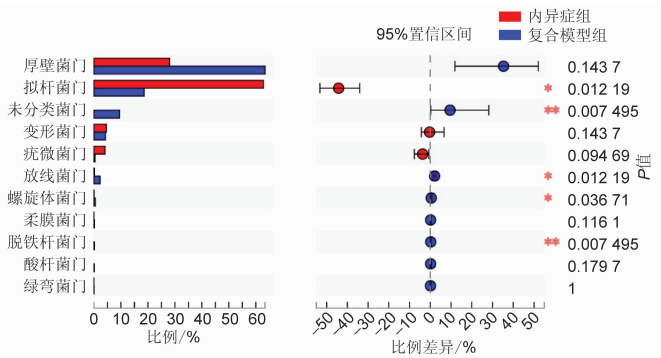


图 3 内异症组与复合模型组小鼠肠道菌群门水平丰度比较

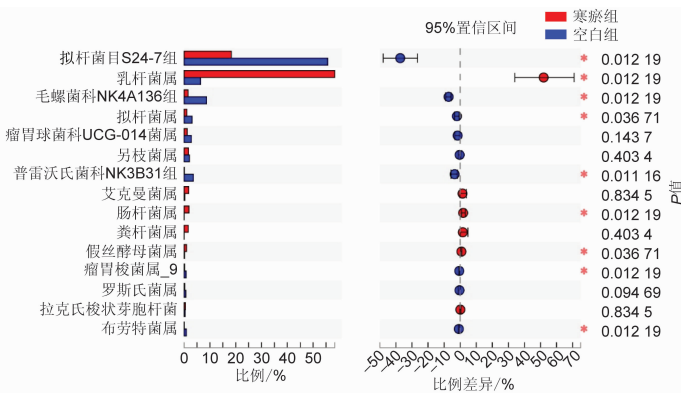


图 4 空白组与寒瘀组小鼠肠道菌群属水平丰度比较

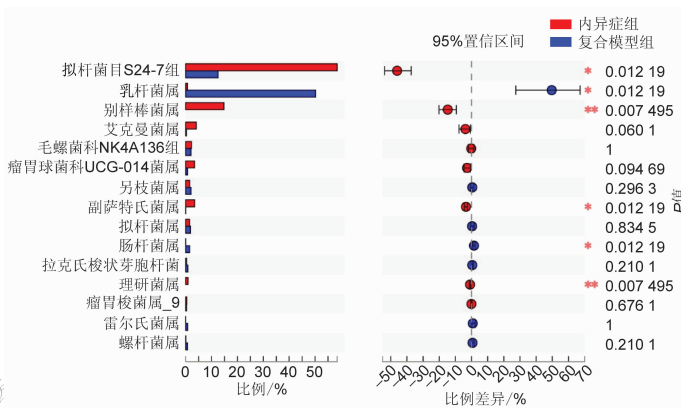


图 5 内异症组与复合模型组小鼠肠道菌群属水平丰度比较

肠道菌群丰度前 15 属水平进行比较,4 组间拟杆菌目 S24-7 组、乳杆菌属、别样棒菌属、毛螺菌科 NK4136 组、拟杆菌属、毛螺旋菌属、肠杆菌属和普雷沃氏菌科 NK3B31 组 差异有统计学意义($P < 0.05$);取丰度前 15 的菌属两两比较分析发现,与空白组比较,寒瘀组小鼠肠道菌群中的乳杆菌属、肠杆菌属和假丝酵母菌属丰度显著增加,而拟杆菌目 S24-7 组、毛螺菌科 NK4A136 组、拟杆菌属、普雷沃氏菌科 NK3B31 组、瘤胃梭菌属_9 和布劳特菌属丰度显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与内异症组比较,复合模型组小鼠肠道菌群中乳杆菌属、肠杆菌属丰度显著增加,而拟杆菌目 S24-7 组、别样棒菌属、副萨特氏菌属和理研菌属丰度显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

3 各组腹腔灌洗液 LPS 浓度比较(表 1) 与空白组比较,寒瘀组小鼠腹腔灌洗液中 LPS 浓度未见明显改变,差异无统计学意义($P > 0.05$),而内异症组及复合模型组显著升高($P < 0.05$)。与寒瘀组比较,复合模型组小鼠腹腔灌洗液中 LPS 浓度显著升高($P < 0.05$)。与内异症组比较,复合模型组小鼠腹腔灌洗液中 LPS 浓度虽升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组小鼠腹腔灌洗液 LPS 浓度比较 (ng/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	LPS
空白	5	0.75 ± 0.08
寒瘀	5	0.75 ± 0.06
内异症	5	0.93 ± 0.15*
复合模型	5	1.06 ± 0.16* [△]

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与寒瘀组比较,[△] $P < 0.05$

讨 论

现代社会生活方式改变,使得人们能够接触到大量反季节性环境与食物,如办公室空调常年运转、经期不注意饮食、过食寒凉冷饮,积年累月会导致女性出现寒凝血瘀的状态,严重的会影响女性正常生理,导致月经紊乱及一系列妇科症状,如痛经、月经不调等。本实验利用寒凝血瘀型内异症雌性小鼠模型观察到肠道菌群结构改变,腹腔内 LPS 浓度增加。

目前,内异症的发病原因尚不清楚,可能与经血逆流、遗传、免疫以及手术等因素相关^[8]。基于肠道菌群与机体免疫功能之间的密切关系,有研究者认为肠道菌群可能对子宫内膜异位症的发生发展起了推动作用,但是肠道菌群失调与子宫内膜异位症发生发展之间的因果关系仍旧存在疑问^[9]。有学者通过动物实验研究发现,内异症动物模型造模前后的肠道菌群结构出现了改

变,而这种改变随着实验时间的延长而更加显著^[6]。

LPS 是绝大多数革兰氏阴性菌外膜的必需组成部分,而这些革兰氏阴性菌每一次进行分裂,就会合成和运输数百万的 LPS 分子^[10]。当细菌死亡溶解或者人为破坏后,大量 LPS 会被释放出来,与人体内各种细胞相互作用,引起机体一系列反应,如持续低度炎症^[11]。肠道菌群结构失调会影响肠道内环境,导致肠壁免疫功能失调、通透性改变^[12],进而可能使得肠道内 LPS 渗透到腹腔内,引起腹腔内环境的改变。有研究认为内异症是一种炎症性疾病,其发生发展与人体盆腔内环境紊乱密不可分^[13]。LPS 是一种典型促炎因子,能够诱发机体产生多种炎症反应因子,从而导致盆腔炎症性环境的出现与维持^[14]。

综上所述,本实验通过观察寒凝血瘀型内异症小鼠模型和内异症小鼠的肠道菌群结构,发现失调的肠道菌群进一步影响了小鼠腹腔内环境,使得腹腔内 LPS 浓度增加。

小鼠肠道菌群组成复杂,主要集中于厚壁菌门和拟杆菌门,而放线菌门、梭杆菌门和疣微菌门等丰度明显较低^[15]。目前有动物研究显示,厚壁菌门水平显著升高及厚壁菌门与拟杆菌门比值显著降低与肥胖疾病发生密切相关^[16],这与另一项人群研究结果相一致^[17],提示厚壁菌门与能量代谢密切相关。在本研究中,笔者发现寒凝血瘀状态下小鼠肠道菌群中厚壁菌门与拟杆菌门比值也存在升高的现象,但这种比值的升高是基于厚壁菌门水平显著升高和拟杆菌门水平显著降低实现。寒凝血瘀状态小鼠代谢能力降低,体内供能存在不足,而丰度显著升高的厚壁菌门是一种产能菌门,能够有效促进小鼠吸收热量和增加体重^[18]。拟杆菌门与碳水化合物代谢基因密切相关^[19],而本研究发现寒凝血瘀状态小鼠肠道内拟杆菌门显著降低,这可能导致食物消化吸收受阻,供能不足,从而导致小鼠寒凝血瘀症状的出现。

在本研究丰度最高的 2 种菌属中,寒瘀组和复合模型组的拟杆菌目 S24-7 组丰度显著低于各自对照组,而乳杆菌属丰度显著高于各自对照组。拟杆菌目 S24-7 组属于拟杆菌门,是革兰氏阴性菌的一种。笔者推测,内异症小鼠肠道菌群种拟杆菌目 S24-7 组在寒凝血瘀状态下大量死亡,导致菌体外膜在肠道内溶解,释放出大量的 LPS。复合模型小鼠腹腔内存在内异病灶,加上肠道内菌群失调,使得肠壁通透性改变导致 LPS 进入腹腔。复合模型小鼠肠道内显著升高的乳杆菌属属于厚壁菌门,是革兰氏阳性菌的一种,能够在厌氧条件下产能,为寒凝血瘀状态小鼠提供热量维

持正常生命活动。

综上所述,本研究发​​现寒凝血瘀型内异症小鼠肠道菌群存在失调,门水平以厚壁菌门显著升高,拟杆菌门显著较低为特征;属水平以乳杆菌属(厚壁菌门)显著升高而拟杆菌目 S24-7 组(拟杆菌门)显著降低为特征。本研究也发现,寒凝血瘀型内异症小鼠肠道菌群能够随着宿主状态的改变而发生纠偏调整,增加厚壁菌门及乳杆菌属数量为宿主提供更多能量以对抗外界影响。此外,失调的肠道菌群与内异症导致的炎性腹腔环境可能共同影响着寒凝血瘀型内异症小鼠肠壁通透性,使得肠道内 LPS 进入小鼠腹腔,进一步促进内异症的发展。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Vercellini P, Somigliana E, Fedele L. Endometriosis: pathogenesis and treatment[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2014, 10(5): 261–275.
- [2] Yu CQ, Yu J, Han J, et al. Regulatory mechanism of malignant behavior of endometriosis mediated by puerarin[J]. *J Chin Integr Med*, 2009, 7(1): 41–47.
- [3] 余燧薇, 赵瑞华, 张润顺, 等. 子宫内膜异位症中医证候要素分布特点多元分析[J]. *环球中医药*, 2017, 10(11): 1242–1247.
- [4] 曹军民, 李娟芳, 李丽, 等. 子宫内膜异位症中医药治疗研究进展[J]. *新中医*, 2018, 50(4): 20–23.
- [5] Zhang YJ, Li S, Gan RY, et al. Impacts of gut bacteria on human health and diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(4): 7493–7519.
- [6] Yuan M, Li D, Zhang Z, et al. Endometriosis induces gut microbiota alterations in mice[J]. *Hum Reprod*, 2018, 33(4): 607–616.
- [7] 周华妙, 郭勇. 寒凝血瘀证小鼠动物模型的建立及评价[J]. *中国中医药科技*, 2010, 17(1): 1–2.
- [8] Peiris AN, Chaljub E, Medlock D. Endometriosis[J]. *JAMA*, 2018, 320(24): 2608.
- [9] Laschke MW, Menger MD. The gut microbiota: A puppet master in the pathogenesis of endometriosis? [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2016, 215(1): 68. e14.
- [10] 莫婷, 刘马峰, 程安春. 革兰氏阴性菌脂多糖运输系统的构成及作用机制[J]. *微生物学报*, 2018, 58(9): 1521–1530.
- [11] 张晓音, 吴旻, 李雨萌, 等. 脂多糖的效应及其机理研究进展[J]. *动物医学进展*, 2015, 36(12): 133–136.
- [12] 王丽娜, 周旭春. 肠道菌群与肠黏膜免疫及相关肠道疾病的研究进展[J]. *中国微生态学杂志*, 2017, 29(4): 494–497.
- [13] 尚秀敏, 闫晶晶, 李佩玲. 炎症因子与子宫内​​膜异位症相关性的研究[J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2015, 49(2): 136–138.
- [14] 陈静波, 董国忠, 孙雅望, 等. 脂多糖引起炎症反应的表观遗传学机制及其营养调控[J]. *动物营养学报*, 2018, 30(1): 59–65.
- [15] Zhang L, Wang Y, Xiayu X, et al. Altered gut microbiota in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 60(4): 1241–1257.
- [16] Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, et al. Obesity alters gut microbial ecology[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(31): 11070–11075.
- [17] Koliada A, Syzenko G, Moseiko V, et al. Association between body mass index and *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio in an adult Ukrainian population[J]. *BMC Microbiol*, 2017, 17(1): 120.
- [18] Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest[J]. *Nature*, 2006, 444(7122): 1027–1031.
- [19] Dugas LR, Fuller M, Gilbert J, et al. The obese gut microbiome across the epidemiologic transition[J]. *Emerg Themes Epidemiol*, 2016, 13: 2.

(收稿: 2019-04-14 在线: 2019-10-12)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶