

# 茯苓多糖通过调节肠道微生物群减轻环磷酰胺引起的肠道屏障和免疫损伤

张越<sup>1,2</sup>, 段雨婷<sup>1</sup>, 张晨<sup>1</sup>, 喻璐喆<sup>1</sup>, 刘颖颖<sup>1</sup>, 邢丽花<sup>1,3</sup>, 王雷<sup>1,3,5</sup>, 俞年军<sup>1</sup>, 彭代银<sup>1,3,4,5</sup>, 陈卫东<sup>1,3,4,5</sup>, 王妍妍<sup>1,3,4</sup>  
<sup>1</sup>安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; <sup>2</sup>安徽协和成药业饮片有限公司, 安徽 亳州 236000; <sup>3</sup>省部共建安徽道地中药材品质提升协同创新中心, 安徽 合肥 230012; <sup>4</sup>中药资源保护与开发研究所, 安徽 合肥 230012; <sup>5</sup>安徽省中药复方重点实验室, 安徽 合肥 230012

**摘要:**目的 研究茯苓多糖(PCP)对环磷酰胺(CTX)诱导的肠道粘膜损伤的修复作用,探讨其对肠道微生物群和代谢产物的影响,以及对肠粘膜损伤小鼠的潜在保护机制。方法 建立CTX诱导的小鼠肠道黏膜损伤模型,观察PCP对肠道屏障和免疫功能的保护作用。小鼠随机分为6组:正常对照组(NC)、CTX模型组(MC)、CTX+谷氨酰胺阳性药物组(PC)、CTX+PCP低剂量组(LD)、CTX+PCP中剂量组(MD)、CTX+PCP高剂量组(HD)。除NC组外,其余各组小鼠连续3 d腹腔注射CTX(80 mg/kg),NC组注射生理盐水。PC组给予谷氨酰胺(300 mg/kg),LD、MD、HD组分别给予PCP(75、150、300 mg/kg),连续灌胃7 d。检测各组小鼠紧密连接蛋白(occludin,ZO-1)表达水平、血清内毒素、D-乳酸盐、二甲氧化酶(DAO)水平、肠道通透性、结肠损伤情况以及细胞因子(IL-4、IL-22、IL-17A、IFN- $\gamma$ 等)水平变化。16S rRNA测序分析肠道微生物群组成变化,气相色谱-质谱法检测短链脂肪酸(SCFAs,如乙酸、丙酸)水平,Western blotting检测GPR41表达。粪菌移植(FMT)实验验证肠道微生物在PCP修复肠道损伤中的作用。结果 与模型组相比,PCP处理组小鼠结肠组织中紧密连接蛋白Occludin和ZO-1表达显著升高( $P<0.001$ ),血清内毒素、D-乳酸盐、DAO水平及肠道通透性均显著降低( $P<0.05$ ),结肠组织中IL-4、IL-22、IL-17A和IFN- $\gamma$ 的mRNA表达水平显著升高( $P<0.001$ )。PCP处理组小鼠肠道中Muribaculaceae相对丰度增加( $P<0.01$ ),Lactobacillus和Bacteroides相对丰度减少( $P<0.05$ ),结肠内容物中乙酸和丙酸含量升高( $P<0.05$ ),GPR41蛋白表达水平显著升高( $P<0.001$ )。FMT实验证实了肠道微生物在PCP修复肠粘膜损伤中的关键作用。结论 PCP能够保护CTX引起的肠粘膜损伤,其机制可能通过调节肠道微生物群和短链脂肪酸的代谢,从而增强肠道的防御能力。

**关键词:**茯苓多糖;肠粘膜损伤;肠道菌群;短链脂肪酸;GPR41

## *Poria cocos* polysaccharide alleviates cyclophosphamide-induced intestinal barrier dysfunction and inflammation in mice by modulating gut flora

ZHANG Yue<sup>1,2</sup>, DUAN Yuting<sup>1</sup>, ZHANG Chen<sup>1</sup>, YU Luzhe<sup>1</sup>, LIU Yingying<sup>1</sup>, XING Lihua<sup>1,3</sup>, WANG Lei<sup>1,3,5</sup>, YU Nianjun<sup>1</sup>, PENG Daiyin<sup>1,3,4,5</sup>, CHEN Weidong<sup>1,3,4,5</sup>, WANG Yanyan<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; <sup>2</sup>Anhui Xiehecheng Pharmacy Traditional Chinese Medicine Co., Ltd, Bozhou 236000, China; <sup>3</sup>MOE-Anhui Joint Collaborative Innovation Center for Quality Improvement of Anhui Genuine Chinese Medicinal Materials, Hefei 230012, China; <sup>4</sup>Institute of Traditional Chinese Medicine Resources Protection and Development, Hefei 230012, China; <sup>5</sup>Anhui Provincial Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula, Hefei 230012, China

**Abstract: Objective** To investigate the protective effects of *Poria cocos* polysaccharide (PCP) against cyclophosphamide (CTX)-induced intestinal mucosal injury and its impact on gut flora and their metabolites in mice. **Methods** Adult BALB/C mice were randomized into normal control group, CTX model group, glutamine (positive control) group, and low-, medium- and high-dose PCP treatment groups. In all but the normal control group, the mice were subjected to modeling of CTX-induced intestinal mucosal injury by intraperitoneal CTX injections for 3 days, followed by treatment with gavage of normal saline, glutamine (300 mg/kg), or PCP at 75, 150, or 300 mg/kg for 7 consecutive days. The colonic expressions of tight junction proteins (occludin and ZO-1), serum endotoxin, D-lactate, and DAO levels, intestinal permeability, colon injury, and colonic cytokine levels (IL-4, IL-22, IL-17A, and IFN- $\gamma$  mRNA) were assessed. Gut microbiota, short-chain fatty acids (SCFAs; mainly acetates and propionates) and colonic GPR41 expression were analyzed using 16S rRNA sequencing, GC-MS, and Western blotting, respectively. Fecal microbiota transplantation (FMT) experiment was conducted to validate the role of gut microbes in

PCP-mediated repair of intestinal injuries. **Results** Compared with those in the model group, the mice treated with PCP showed significantly increased colonic occludin and ZO-1 expressions, reduced serum endotoxin, D-lactate and DAO levels, and lowered intestinal permeability with increased colonic expressions of IL-4, IL-22, IL-17A, and IFN- $\gamma$  mRNA. PCP treatment obviously increased the abundance of *Muribaculaceae*, decreased *Lactobacillus* and *Bacteroides*, increased the contents of acetate and propionate in the colon, and upregulated colonic GPR41 expression. The results of FMT experiment confirmed the crucial role of gut microbes in PCP-mediated repair of CTX-induced intestinal injuries in mice. **Conclusion** PCP can protect

收稿日期:2025-07-11

**基金项目:**国家自然科学基金青年项目(82505171,82204748);国家自然科学基金区域创新发展联合基金(U25A20173);安徽省科技创新攻坚计划项目(202423110050002);安徽省科技特派员示范项目(皖科生秘[2024]407号);高水平中医药重点学科建设项目(zyzdxk-2023095);安徽省高校科研计划项目团队项目(2022AH010036)  
Supported by Natural Science Foundation for the Youth (NSFY) of China (82505171,82204748).

**作者简介:**张越,博士后,E-mail: zhangyue@ahtcm.edu.cn;段雨婷,硕士,E-mail: 1651240443@qq.com。张越、段雨婷共同为第一作者  
**通信作者:**陈卫东,博士,教授,E-mail: wdchen@ahtcm.edu.cn;王妍妍,博士,教授,E-mail: wangyanyan@ahtcm.edu.cn

against CTX-induced intestinal mucosal injury in mice possibly by modulating gut flora and SCFAs metabolism to enhance intestinal defense capacity.

**Keywords:** *Poria cocos* polysaccharide; intestinal mucosal injury; gut flora; short-chain fatty acids; GPR41

环磷酰胺(CTX)是一种广泛使用的化疗药物,可用于治疗多种癌症和自身免疫性疾病,如直肠癌、肝癌和溃疡性结肠炎<sup>[1]</sup>。然而,CTX治疗会导致各种副作用,如胃肠道黏膜损伤、肠道通透性增加、免疫功能降低、微生物群紊乱<sup>[2]</sup>。以往的研究表明,CTX会导致一些革兰氏阳性细菌迁移到淋巴结组织,并改变肠道微生物群<sup>[3]</sup>。因此,亟需开发能够减轻CTX的副作用的免疫调节剂。

肠道黏膜是一种复杂的屏障,不仅具有物理隔离,营养吸收、免疫调节和其他多种生物学功能,而且能够保护宿主免受毒素和病原微生物的侵袭<sup>[4]</sup>。肠道微生物是肠道微环境及肠屏障的重要调控因子,构成肠道的微生物屏障,维持肠道和机体健康,肠道微生物紊乱会破坏肠黏膜屏障<sup>[5]</sup>。研究表明,通过调节肠道微生物是改善肠黏膜损伤的重要途径之一<sup>[6]</sup>。肠道微生物通过发酵膳食纤维产生代谢物短链脂肪酸(SCFAs),能够调控肠道免疫反应并减轻炎症<sup>[7]</sup>。SCFAs可通过结合并作用于G蛋白偶联受体(GPR),例如GPR41,在维持肠道屏障和免疫稳态中至关重要<sup>[8]</sup>。

中药多糖是中药的重要活性成分之一,在调节环磷酰胺诱导的免疫低下和肠道损伤中具有显著的作用,但是具体的作用机制不清<sup>[9,10]</sup>。茯苓为多孔菌科真菌 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核,是我国常用的一种传统中草药和功能食品,已有 2000 多年的历史<sup>[11]</sup>。茯苓多糖(PCP)是茯苓的主要活性成分之一,具有抗肿瘤、保肝、抗炎、抗氧化和调节免疫的作用<sup>[12-15]</sup>。前期研究表明<sup>[16,17]</sup>,PCP对环磷酰胺复制的模型小鼠具有显著的免疫调节作用,但具体作用机制及PCP对环磷酰胺诱导的肠道黏膜损伤的修复作用未见到报道。课题组研究表明,PCP是相对分子质量为 11 583 的多糖,主要由甘露糖、D-氨基葡萄糖盐酸盐、葡萄糖、半乳糖和岩藻糖组成。其骨架结构可能包含 t-Gal(p)、6-Gal(p) 和 2,6-Gal(p)<sup>[14]</sup>。在正常大鼠中,PCP 可通过改变肠道微生物群组成和 SCFAs 水平来调节肠道屏障功能和免疫功能<sup>[14]</sup>。但是 PCP 是否能够通过调节肠道微生物改善 CTX 诱导的肠道黏膜损伤和免疫功能及其作用机制尚不清楚。因此,本研究采用 CTX 诱导小鼠肠损伤和免疫低下模型,探究 PCP 通过调节肠道微生物群和 SCFAs 的代谢改善 CTX 诱导肠损伤小鼠的作用,并采用粪菌移植实验进行验证。本研究为 PCP 益生元和免疫佐剂的开发提供数据支撑,同时为多糖减轻 CTX 的副作用提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂与仪器

环磷酰胺(阿拉丁生化科技股份有限公司),小鼠二胺氧化酶(DAO)ELISA试剂盒、小鼠粘蛋白2(MUC2)ELISA试剂盒(泉州市睿信生物科技公司),TRIZOL试剂(Ambion),反转录试剂盒(兰杰柯科技有限公司),DDGTO SYBR Premix ExTag™ 试剂盒(东洋纺(上海)生物科技公司),EZNA™ Mag-Bind DNA 试剂盒(Omega),盐酸饱和氯化钠溶液(北京谱析标准技术有限公司),内参 GAPDH 一抗(山东思科捷生物科技公司),小鼠 GPR41 抗体(成都正能生物技术有限责任公司),Multiskan Spectrum 酶标仪(赛默飞世尔科技公司),Analytic jena 核酸蛋白检测仪(安徽徽特医疗科技发展有限公司),C1000 Touch 荧光定量 PCR 仪(BIO-RAD 公司)。

### 1.2 茯苓多糖的制备和提取

茯苓是由安徽省金山寨食(药)用菌种植专业合作社统一加工提供,经安徽中医药大学生药系俞年军教授鉴定为多孔菌科真菌茯苓 (*Poria cocos* Schw. Wolf) 的干燥菌核,PCP 是经水醇沉淀法分离制备,其提取与纯化过程严格依据课题组前期方法开展<sup>[18]</sup>。茯苓粉末首先用蒸馏水提取 2 次(1:20, 60 °C)提取茯苓粉 2 次,然后用乙醇(80%~95%)混合沉淀。根据 Sevage 方法对粗多糖进行脱蛋白处理后对多糖溶液进行透析和冻干,得到茯苓多糖。本研究中使用的 PCP 相对分子质量为 11 583,具有独特的多糖形态。它主要由以下摩尔比组成:甘露糖、D-氨基葡萄糖盐酸盐、葡萄糖、半乳糖和岩藻糖的摩尔比分别为 15.308:0.967:28.723:31.631:23.371。根据甲基化分析,t-Gal(p)、6-Gal(p)和 2,6-Gal(p)可能构成了 PCP 的骨架<sup>[14]</sup>。

### 1.3 动物与实验设计

药效学实验设计:雌性 SPF BALB/C 小鼠,体质量 20.0±2.0 g,6~8 周龄,购自杭州子源实验动物科技有限公司(SCXK-2019-0004)。所有实验过程均遵循安徽中医药大学动物伦理委员会的规定(伦理批号:AHUCM-MOUSE-2021033)。小鼠在室温 24±2 °C、相对湿度(55±5)%、12 h 周期性光照。适应环境后分随机 6 组:正常对照组(NC)、CTX 模型组(MC)、CTX+谷氨酰胺(Gln)阳性药物组(PC)、CTX+茯苓多糖低剂量组(LD)、CTX+茯苓多糖中剂量组(MD)、CTX+茯苓多糖高剂量组(HD)。除 NC 组小鼠外,所有小鼠连续 3 d 腹腔注射 80 mg/kg 的 CTX,1 次/d。NC 组小鼠注射生理盐水<sup>[19]</sup>。PC 组的小鼠在接下来的 7 d 中灌胃 300 mg/kg 的谷氨

酰胺,而NC组和MC组的小鼠则服用生理盐水。LD、MD和HD组的小鼠分别灌胃PCP 75、150和300 mg/kg。

粪菌移植(FMT)实验设计:收集上述NC组、MC组和高剂量PCP组的供体小鼠新鲜排出的粪便;将粪便样本置于预冷的无菌生理盐水中,充分混匀,制备成浓度为50 mg/mL的均匀悬浮液;将样品置于4 °C条件下,以2800 r/min的转速离心2 min,收集上清液作为粪菌移植的供体悬液<sup>[20]</sup>。将受体小鼠随机分为3组( $n=6$ ): ABX+CTX+FMT-NC组(FMT<sub>NC</sub>)、ABX+CTX+FMT-MC组(FMT<sub>MC</sub>)和ABX+CTX+FMT-PCP组(FMT<sub>PCP</sub>)。各组小鼠自由饮用含1 g/L氨苄西林、1 g/L甲硝唑、0.5 g/L万古霉素和0.5 g/L新霉素的抗生素水7 d以复制伪无菌的肠道环境<sup>[21]</sup>,在10~13 d腹腔注射80 mg/kg CTX。在第14~21天,分别灌胃NC组、MC组和高剂量PCP组小鼠的供体悬液。

#### 1.4 ELISA分析

通过摘眼球采集小鼠血液样本,离心获得血清,然后使用ELISA试剂盒,按照制造商的说明检测内毒素、DAO和D-乳酸的浓度。同时解剖小鼠结肠组织,进行研磨离心,取其上清液测定MUC2的表达。

#### 1.5 qRT-PCR法分析

采用TRIZOL试剂法提取结肠组织总RNA,使用反转录试剂盒合成cDNA。通过SYBR Premix ExTaq<sup>TM</sup>扩增并分析cDNA片段以测定基因表达水平。通过2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup> 进行数据分析。 $\beta$ -actin被确定为标准化的管家基因,检测IL-4、IL-22、IL-17A和IFN- $\gamma$ 等mRNA表达水平。

#### 1.6 HE染色

取1 cm结肠组织经4%的多聚甲醛固定24 h后,将固定样本置于组织脱水机中脱水过夜。经常规脱水、透明、浸蜡和包埋后然后在切片机上进行5  $\mu$ m厚度的连续切片,经捞片、烤片后,置于载玻片上风干。

将制备好的石蜡切片依次用二甲苯I和II脱蜡各10 min。随后,切片依次用100%、90%、80%和70%乙醇各5 min进行复水处理,并在脱蜡后用去离子水清洗。苏木精染色20 min后,水洗后切片,用0.2%伊红染液复染2 min,再用95%乙醇处理2 min。脱水处理后,切片依次用95%、100%乙醇I和II处理,最后用二甲苯透明化,中性树胶封片,置于光学显微镜下观察并拍照。

#### 1.7 PAS染色

如上所述,石蜡切片经脱蜡、复水、用去离子水冲洗并苏木精染色5~10 min。随后,切片用足量清水冲洗,用高碘酸染色10 min,蒸馏水冲洗;Schiff氏染液染色10~20 min,倾去染液,接着滴加偏重亚硫酸钠,作用1 min,然后流水冲洗10 min,最后脱水、透明、封固。

#### 1.8 免疫荧光染色

将5  $\mu$ m厚的石蜡包埋结肠组织标本切片用二甲苯脱蜡,用不同浓度的酒精溶液脱水,然后用柠檬酸缓

冲液进行抗原修复,并在室温下用10%马血清封闭30 min。将切片在4 °C下与ZO-1、Occludin一抗(一抗稀释比例1:500)一起温育过夜,然后与花青(CY2)缀和的山羊抗兔二抗(二抗稀释比例1:10 000)在室温下保持1 h。用PBS洗涤后,将切片用4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色进行核染色。然后,将切片用具有DAPI的Fluoroshield封固剂固定。使用荧光显微镜获取图像,Image J软件进行定量分析。

#### 1.9 肠道微生物区系的16S rRNA测序

从小鼠结肠内容物中提取DNA使用EZNA<sup>TM</sup> Mag-Bind Soil DNA试剂盒。通过PCR扩增细菌16S rRNA基因的V3/V4区域,引物为343F(TACGGRAGGCAGCAG)和798R(AGGGTATCTAATCCT)。PCR产物经纯化、定量并标准化后,使用TruSeq Nano DNA LT Library Preparation试剂盒构建测序文库。测序在Illumina MiSeq平台上进行。以Goods coverage指数作为反映测序深度的指标,以Chao1和ACE指数反映微生物的丰富度,Shannon和Simpson指数反应了肠道菌群的多样性。同时采用LEfSe分析出差异的肠道微生物。

#### 1.10 利用气相色谱-质谱法(GC-MS)测定SCFAs的含量

本研究,根据课题组前期方法的基础上进行改动<sup>[22]</sup>,采用GC-MS分析乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸和异戊酸。选择乙酸,丙酸,丁酸,异丁酸,戊酸,异戊酸作为标准品,并作出标准曲线。根据标准品的保留时间和质谱特征确定样品中的短链脂肪酸的种类,根据标准曲线计算出具体短链脂肪酸的含量。

样品处理:将结肠内容物冻干并研磨成粉末,取冻干粉适量与150  $\mu$ L 1 mol/L盐酸饱和氯化钠的溶液混合。加入1.5 mL含内标物(2-乙基丁酸酯,5.0  $\mu$ g/mL)的乙酸乙酯,将样本放于均质器上研磨混匀,经10 000 r/min离心10 min后取200  $\mu$ L上清,放入100.0 mg硫酸镁干燥后,16 000 r/min离心10 min,再取150  $\mu$ L上清,用50.0 mg硫酸镁干燥,经16 000 r/min离心10 min后,取72  $\mu$ L上清置于密封气相小瓶中,加入18  $\mu$ L衍生化试剂MTBSTFA,旋紧瓶盖,混匀后置于80 °C水浴中加热20 min后,将样本放于室温衍生化8 h,过0.22  $\mu$ m滤膜后,4 °C冷藏保存备用。色谱条件:RTX-5MS色谱柱(30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25  $\mu$ m),载气为氦气(流速1.0 mL/min)。程序升温为起始温度为40 °C,保持3 min,以40 °C/min升至60 °C并保持3 min;以10 °C/min升至110 °C保持5 min;最后以40 °C/min升至210 °C保持1 min。进样口温度200 °C,检测器温度230 °C。进样量1  $\mu$ L,分流比100:1。

质谱条件:电子电离EI,电子能量70 eV,离子源温度200 °C,接口温度220 °C,溶剂延迟时间为4 min,采用全扫描方式,扫描范围为30~300 m/z。

### 1.11 Western blotting 分析

取 100 mg 的结肠组织,使用液氮从结肠组织中提取蛋白,采用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度,按 4:1 加入上样缓冲液,将蛋白于 100 °C 加热变性 10 min。制备 10% SDS-PAGE 凝胶分离蛋白,进行上样、电泳、转膜。蛋白转移后,用 5% 脱脂牛奶阻断 PVDF 膜。将膜放入 GAPDH、GPR41 一抗(稀释比 1:1000)中孵育过夜,然后与特定的二抗(1:10 000)孵育。用极超敏化学发光试剂盒检测抗原-抗体复合物,并用 ImageJ 进行灰度分析。

### 1.12 统计学分析

使用 SPSS 23.0 软件进行统计分析。数据用均数±标准差表示。对于方差齐符合正态分布的计量资料,级别比较采用单因素方差分析,采用 LSD 分析进行多组之间的两两比较, $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 茯苓多糖对 CTX 治疗小鼠结肠生理状态的影响

本研究建立了 CTX 诱导的小鼠肠黏膜损伤模型(图 1A)。与 NC 组相比,CTX 组的胸腺指数和脾脏指数降低( $P < 0.001$ ),表明 CTX 治疗对这些免疫器官造成严重损伤,PCP 干预后的小鼠脾脏和胸腺指数增加( $P < 0.05$ ,图 1B、C)。CTX 处理缩短结肠长度( $P < 0.05$ )并降低结肠指数( $P < 0.01$ ,图 1D、E),高剂量 PCP 可改善这一现象。HE 染色组织病理分析显示 NC 组肠黏膜结构完整,上皮细胞排列整齐紧密;相反,MC 组肠黏膜结构严重损伤,肌层和黏膜层厚度显著减少,PCP 干预(尤其是高剂量 PCP 组)治疗明显改善上述病理变化(图 1F)。

### 2.2 PCP 对 CTX 处理小鼠肠道屏障功能的影响

CTX 处理后,MC 组小鼠 Occludin 和 ZO-1 表达降低( $P < 0.001$ ),与 MC 组小鼠相比,PCP 各剂量均可增加 ZO-1 表达,中高 PCP 剂量组可增加 Occludin 的表达( $P < 0.01$ ,图 2A~D)。此外,CTX 处理后的 MC 组小鼠中杯状细胞的数量( $P < 0.001$ )和 MUC2 的分泌减少(图 2E、F),血清内毒素、DAO 和 D-乳酸水平升高( $P < 0.001$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ ,图 2G~I)。PCP 干预后,高剂量 PCP 可恢复杯状细胞数的数量( $P < 0.001$ )和增加 MUC2 的表达( $P < 0.05$ ),降低血清内毒素 DAO 和 D-乳酸的水平。中剂量 PCP 降低了 DAO 和 D-乳酸水平( $P < 0.001$ 、 $P < 0.01$ ),而低剂量 PCP 仅降低了 DAO 水平( $P < 0.01$ )。

### 2.3 PCP 对小鼠结肠黏膜免疫细胞因子的影响

qRT-PCR 检测结果显示,与 NC 组相比,MC 组中 Th2 相关(IL-4、IL-5、IL-13)、Th17 相关(IL-17A、IL-17F、IL-22)和免疫调节因子(IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ )表达下调( $P < 0.05$ ,图 3A~H)。然而,这些细胞因子的含量通过 Gln 与 PCP 处理后而升高( $P < 0.01$ ),且呈剂量依赖性。

### 2.4 PCP 对 CTX 处理小鼠肠道菌群组成的影响

以 Goods coverage 指数作为反映测序深度的指标,同时采用 Chao1 和 ACE 指数反映微生物的丰富度,Shannon 和 Simpson 指数反应了肠道菌群的多样性(表 1)。各组的 Goods coverage 指数为 1,表明测序深度适合肠道菌群分析。MC 组小鼠的 Chao1、ACE、Shannon 和 Simpson 指数低于 NC 组小鼠,在高剂量 PCP 处理后,指数增加,表明高剂量 PCP 可以提高肠道菌群的丰富度和多样性。Rank abundance 曲线变宽并趋于平稳,表明物种组成丰富且均匀程度高(图 4A)。主坐标分析(PCoA)结果显示,NC、MC 和 HD 组形成独立聚类,组间分离明显,证实了分组的有效性和肠道微生物组成显著差异(图 4B)。此外,对常见 OTUs 的 Venn 图分析(图 4C)显示 NC、MC 和 HD 组共包含 198 个 OTUs,NC、MC 和 HD 组分别有 110、125 和 776 个独特 OTUs。

在门水平上,主要包括 *Bacteroidota*、*Firmicutes*、*Actinobacteriota*、*Campilobacterota*、*Desulfobacterota* 共 5 各菌门,其中 *Bacteroidota* 和 *Firmicutes* 的丰富度是两个优势菌门,约占总菌群的 90%(图 4D)。与 NC 组相比,MC 组小鼠 *Firmicutes* 的相对丰度显著高于 NC 组小鼠( $P < 0.05$ ),*Bacteroidota* 相对丰度显著低于 NC 组小鼠( $P < 0.01$ ,图 4F、G),MC 组小鼠的 *Firmicutes*/*Bacteroidota* 的比值明显高于 NC 组小鼠( $P < 0.05$ ,图 4H),其他菌群无显著变化。高剂量 PCP 处理后逆转了菌群的相对丰度,*Firmicutes*/*Bacteroidota* 的比值显著下降( $P < 0.05$ )。在属水平上(图 4E),*Muribaculaceae*、*Lactobacillus*、*Bacteroides*、*Alistipes* 和 *Prevotellaceae*\_UCG-001 的相对丰度存在显著差异,与 NC 小鼠相比,MC 组小鼠的 *Muribaculaceae* 相对丰度较低,而 *Lactobacillus* 和 *Bacteroides* 的丰度较高,高剂量 PCP 给药后,显著逆转了上述菌群的相对丰度( $P < 0.05$ ,图 4I~K)。

LEfSe 分析结果(图 4L)表明,NC 组小鼠以 *Bacteroidota*、*Bacteroidia*、*Bacteroidales* 为主要菌群,而 MC 组小鼠以 *Clostridia*、*Lachnospirales*、*Lachnospiraceae* 为主要菌群。通过物种分支例图(图 4M)PCP 能重塑 CTX 小鼠肠道菌群,提升 *Muribaculaceae* 相对丰度同时降低了 *Lactobacillus* 和 *Bacteroides* 的丰度。

### 2.5 PCP 对 CTX 处理小鼠短链脂肪酸(SCFAs)含量的影响

气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术对结肠样本中的 6 种短链脂肪酸(乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸和异戊酸)定量分析结果显示,其中异丁酸和异戊酸未被检测到(图 5A、B)。与 NC 组相比,MC 组小鼠结肠内容物中乙酸、丙酸含量降低( $P < 0.05$ )。与 MC 组相比,中剂量和高剂量 PCP 处理后升高了乙酸和丙酸的含量( $P < 0.05$ ,图 5C~F)。其余短链脂肪酸无显著差异。

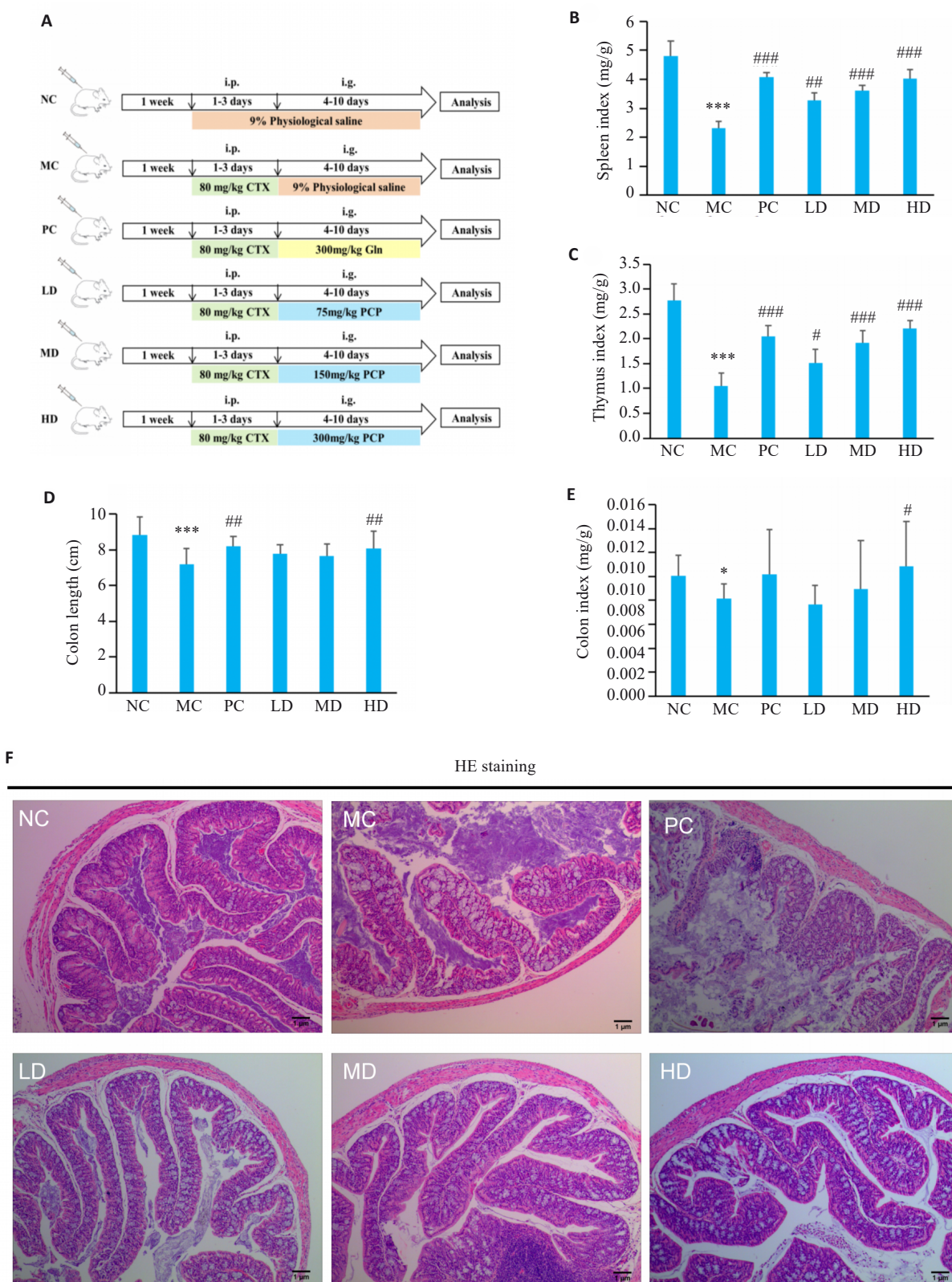


图 1 PCP对CTX 治疗小鼠结肠生理状态的影响

Fig. 1 Effect of PCP on physiological state of the colon in CTX-treated mice. A: Illustration of the experiment design. i. p.: Intraperitoneal injection, i. g.: Irrigation. B: Spleen index (spleen weight/body weight). C: Thymus index (thymus weight/body weight) of the mice. D: Colon length of the mice. E: Colon index (colon weight/body weight). F: HE staining of the colon tissue (Original magnification:  $\times 7.5$ ). NC: Control group; MC: CTX model group; PC: CTX+Glutamine (positive drug) group; LD: CTX+PCP low dose group; MD: CTX+PCP medium dose group; HD: CTX+PCP high dose group. Data are presented as Mean $\pm$ SD (n=6). \*P<0.05, \*\*\*P<0.001 vs NC group; #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001 vs MC group.

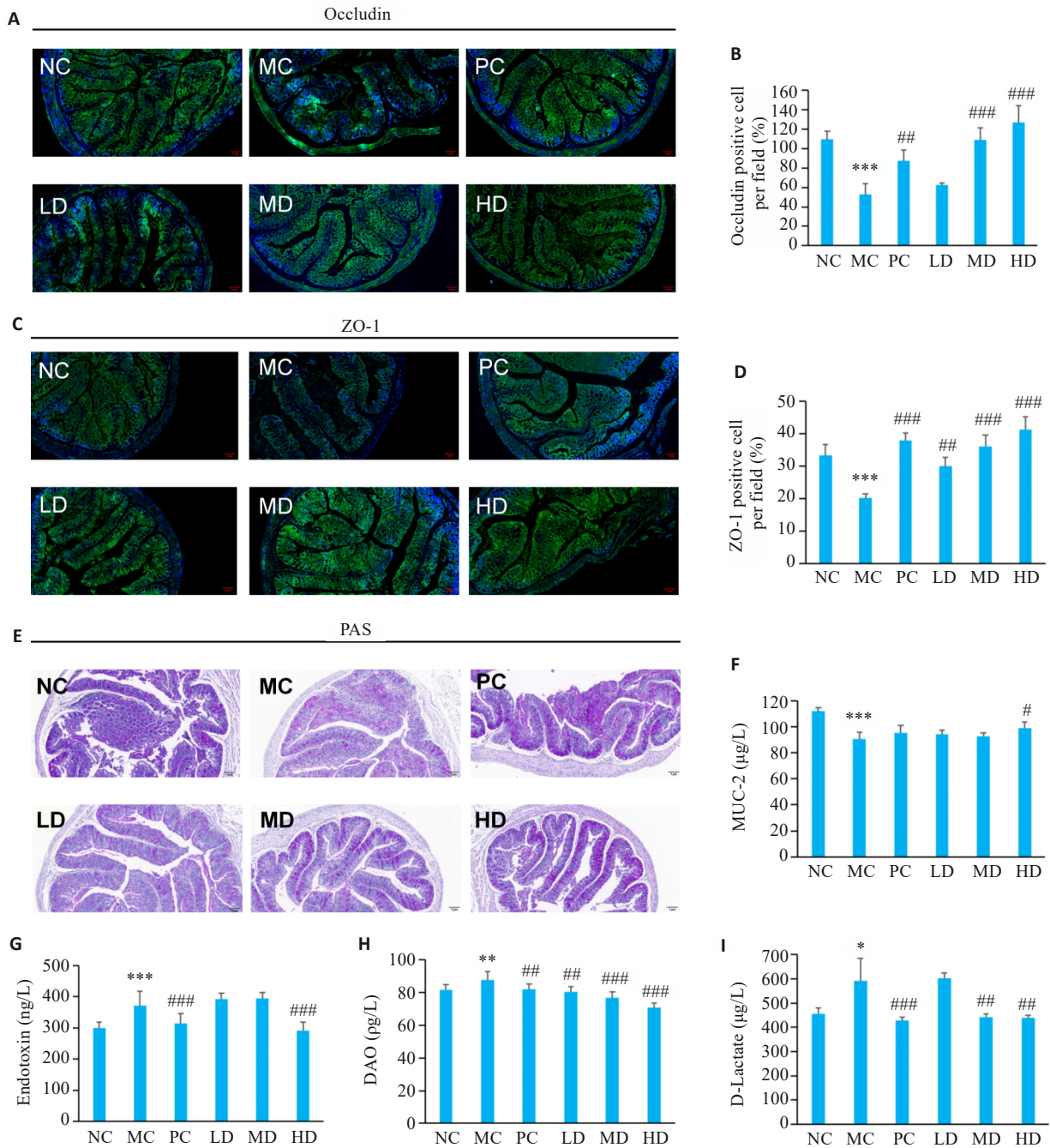


图2 PCP对CTX处理小鼠肠道屏障功能的影响

Fig.2 Effect of PCP on intestinal barrier function in CTX-treated mice. **A-D**: Immunofluorescence staining of occludin and ZO-1 (green: occludin and ZO-1; blue: nucleus;  $\times 7.5$ ). **E**: PAS staining showing mucus-secreting epithelial cells ( $\times 7.5$ ). **F**: MUC2 contents in colonic tissues. **G**: Endotoxin levels in serum. **H**: DAO levels in serum. **I**: D-Lactate levels in serum. Data are presented as  $Mean \pm SD$  ( $n=6$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs NC group; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  vs MC group.

对显著变化的菌属(如 *Muribaculaceae*、*Lactobacillus*、*Bacteroides* 和 *Firmicutes*)与短链脂肪酸(乙酸、丙酸、丁酸、戊酸)进行 Spearman 相关性分析(图 5G)。结果显示,*Muribaculaceae* 与乙酸、丙酸均呈强正相关( $r=0.67, P < 0.001$ ), *Bacteroides* 亦与二者正相关( $r=0.33, P < 0.01$ ), 提示这些菌属可能在促进 SCFAs 合成种发挥关键作用;相反, *Lactobacillus* 和 *Firmicutes* 与丙酸呈强负相关( $r=-0.67, P < 0.001$ ), 与乙酸呈负相关( $r=-0.33, P < 0.01$ )。

MC组中GPR41的表达显著下调( $P < 0.001$ ),而所有PCP治疗组均通过PCP处理逆转了这一现象(图 5H,I)。

### 2.6 FMT对CTX处理小鼠结肠生理状态的影响

粪菌移植实验结果显示,与FMT<sub>NC</sub>组相比,FMT<sub>MC</sub>组的胸腺指数和脾脏指数显著降低( $P < 0.05$ ,图 6A),结肠长度显著变短( $P < 0.05$ ),结肠指数显著降低( $P < 0.001$ ),FMT<sub>PCP</sub>干预有效地逆转了这一现象(图 6B-E)。组织病理学显示,与FMT<sub>NC</sub>组相比,FMT<sub>MC</sub>组结肠黏膜结构严重受损,炎症细胞浸润显著增加;PCP干预后,FMT<sub>PCP</sub>组

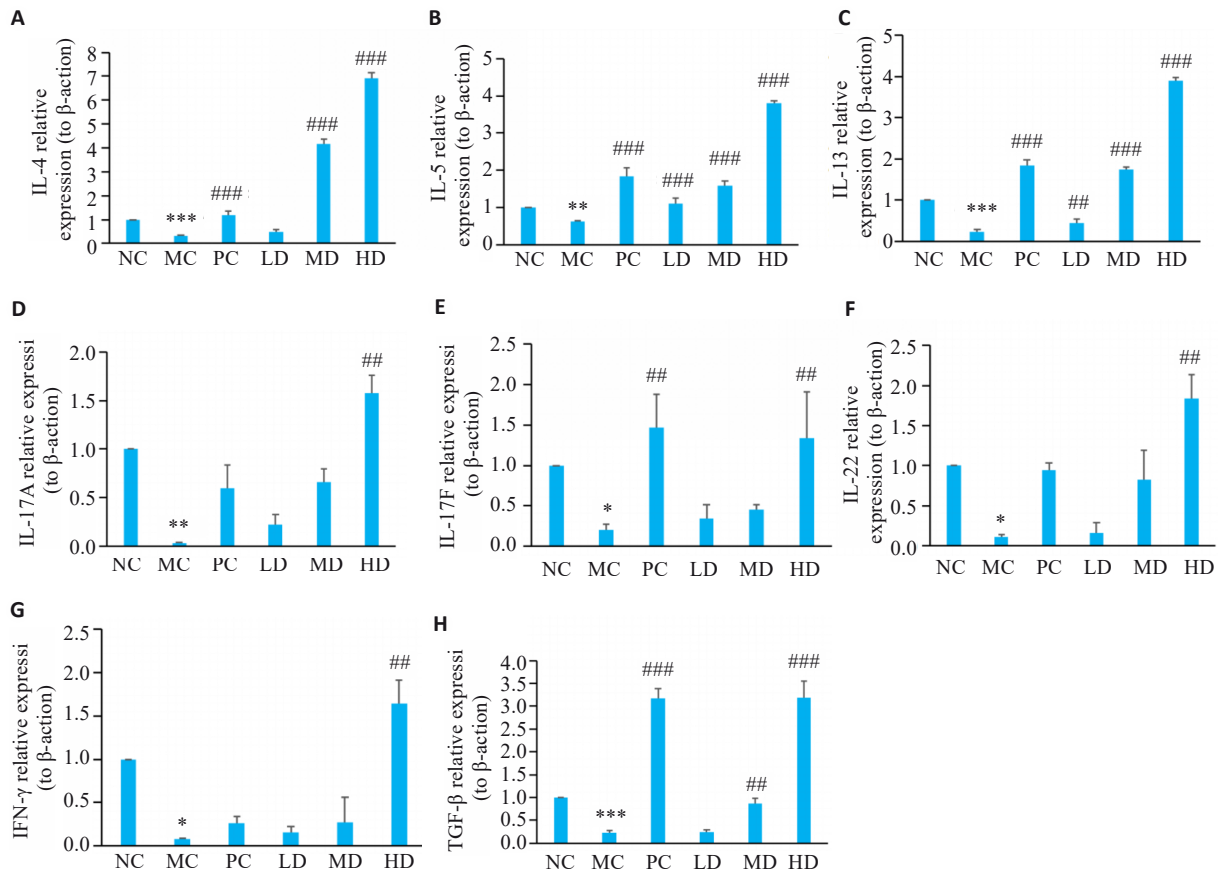


图3 PCP对小鼠结肠黏膜免疫细胞因子的影响

Fig.3 Effect of PCP on immune cytokines in the colonic mucosa of the mice. A-H: Relative mRNA expression levels of IL-4, IL-5, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-22, IFN- $\gamma$ , and TGF- $\beta$  detected with RT-qPCR, using  $\beta$ -actin as the reference control. Data are represented as Mean $\pm$ SD (n=6). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs NC group, #P<0.01, ###P<0.001 vs MC group.

结肠黏膜结构趋于完整,炎症浸润显著减轻(图6F)。

qRT-PCR检测结肠组织中的细胞因子水平(图6G),与FMT<sub>NC</sub>组相比,FMT<sub>MC</sub>组中Th2相关(IL-4、IL-5、IL-13)、Th17相关(IL-17A、IL-17F、IL-22)和免疫调节因子(IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ )表达显著下调,FMT<sub>PCP</sub>治疗恢复了细胞因子的水平。

### 2.7 FMT对小鼠结肠通透性的影响

免疫荧光分析显示,与FMT<sub>NC</sub>组相比,FMT<sub>MC</sub>组的Occludin和ZO-1表达显著减少(P<0.001),FMT<sub>PCP</sub>干预显著上调了这些紧密连接蛋白的表达,恢复了屏障的完整性(P<0.001,图7A~D)。组织病理学评估结果显示FMT<sub>MC</sub>样本中的PAS阳性杯状细胞减少,而FMT<sub>PCP</sub>治疗有效逆转了这一现象(图7E)。ELISA定量分析显示FMT<sub>MC</sub>组MUC-2减少(P<0.05),而FMT<sub>PCP</sub>组则恢复了MUC-2的表达(P<0.01)。此外,FMT<sub>MC</sub>小鼠表现出肠道损伤血清标志物(内毒素、DAO、D-乳酸)升高,而FMT<sub>PCP</sub>组显著降低了肠道损伤血清标志物(内毒素、DAO、D-乳酸)的含量(图7F)。

### 2.8 FMT对小鼠结肠SCFAs含量和GPR41的影响

SCFAs的定量分析结果显示,与FMT<sub>NC</sub>组相比,FMT<sub>MC</sub>组的乙酸和丙酸浓度显著降低(P<0.001,P<0.01),

而丁酸和戊酸水平没有显著变化,FMT<sub>PCP</sub>干预显著提高了乙酸和丙酸的含量(P<0.05,图8A~D)。与FMT<sub>NC</sub>组相比,FMT<sub>MC</sub>组中GPR41的表达显著下调(P<0.001),而PCP干预后逆转了这一现象(图8E、F)。

## 3 讨论

化疗仍是肿瘤治疗的基石,但其常伴随不良反应,包括肠道黏膜屏障损伤和免疫抑制<sup>[23]</sup>。环磷酰胺是一种广泛使用的广谱抗肿瘤药物,已知会导致骨髓功能抑制、免疫功能减弱,并干扰肠道黏膜屏障<sup>[3]</sup>。由于这些特性,它常被用于建立小鼠免疫抑制和肠道损伤模型。近年来研究表明,天然产物(如多糖)在增强肠道黏膜屏障功能和调节免疫中具有作用明显。然而,大多数多糖本身可能无法被宿主直接消化,其主要治疗机制是通过改变肠道菌群及其代谢产物实现<sup>[24,25]</sup>。如冬虫夏草多糖<sup>[26]</sup>、姜黄多糖<sup>[27]</sup>及天麻多糖<sup>[28]</sup>及苍术多糖<sup>[29]</sup>均可通过改善菌群失衡,促进SCFAs的生成途径缓解环磷酰胺诱导的小鼠肠道屏障与免疫损伤,但是其具体机制及多糖与肠道微生物之间相互关系有待进一步阐明。本研究建立环磷酰胺诱导的免疫抑制和肠道损伤小鼠模型,探究PCP通过调节肠道微生物及其代谢物缓解环磷酰

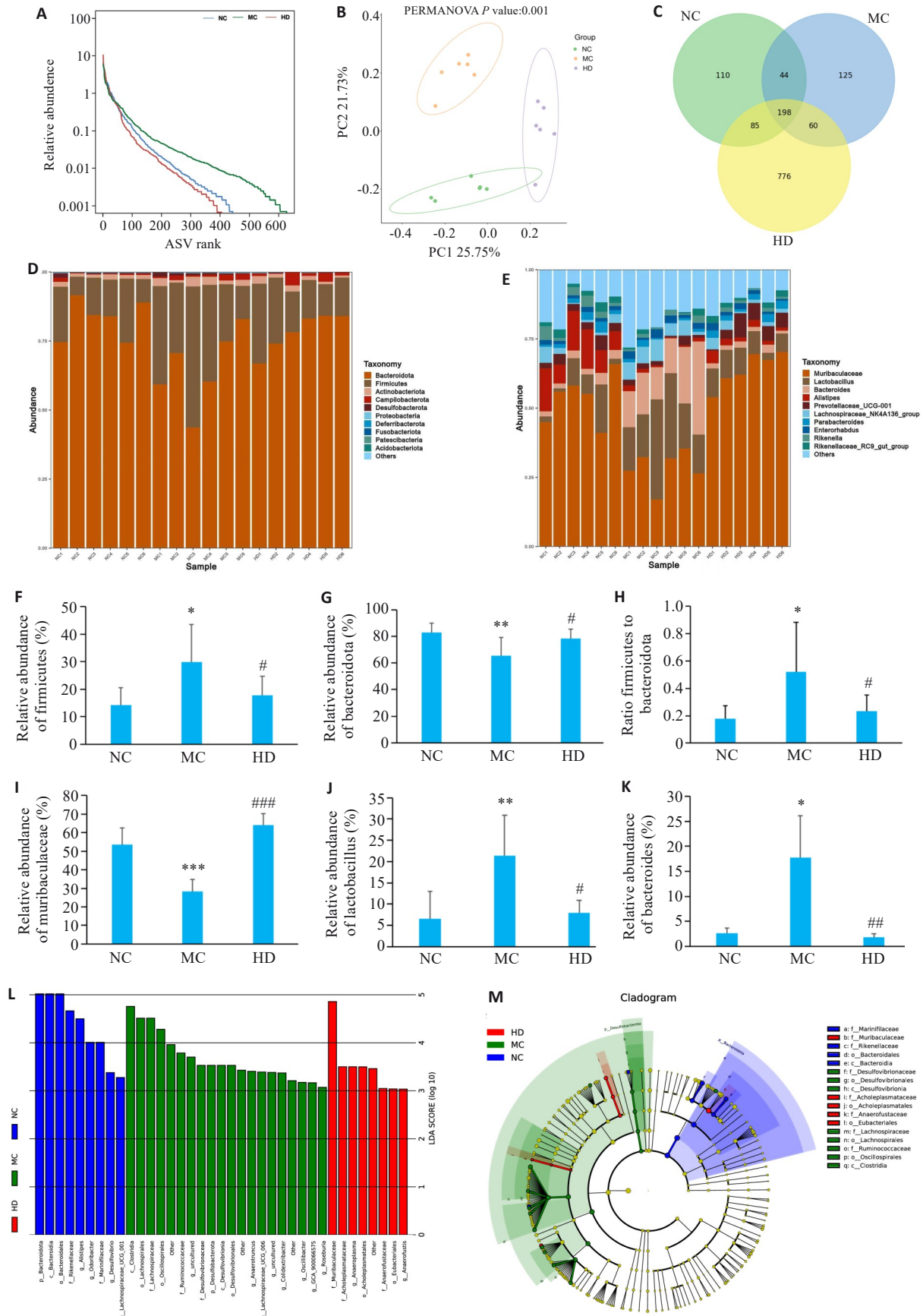


图4 PCP对CTX处理小鼠肠道菌群组成的影响

Fig.4 Effect of PCP on gut microbiota composition in CTX-treated mice. **A**: Species abundance distribution curve. **B**: Principal coordinates analysis. **C**: Venn graph showing species overlap. **D**: Phylum-level microbial composition. **E**: Genus-level microbial composition. **F**: Firmicutes abundance. **G**: Bacteroidetes abundance. **H**: Firmicutes-to-Bacteroidetes ratio. **I**: Muribaculaceae abundance. **J**: Lactobacillus abundance. **K**: Bacteroides abundance. **L**: LDA score. **M**: Phylogenetic distribution of discriminant taxa. Data are represented as Mean±SD (n=6). \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001 vs NC group; # $P$ <0.05, ## $P$ <0.01, ### $P$ <0.001 vs MC group.

表1 NC组、MC组与HD组肠道菌群多样性指数比较

Tab.1 Diversity indexes of gut microbiota in NC, MC, and HD groups (Mean±SD, n=6)

Group	Chao1	ACE	Shannon	Simpson	Goods_coverage
NC	195.22±50.78	195.79±51.02	5.81±0.21	0.97±0.00	1.00
MC	182.98±17.05	183.05±16.94	5.51±0.23	0.96±0.01	1.00
HD	275.21±52.61	274.09±51.86	6.32±0.44	0.98±0.01	1.00

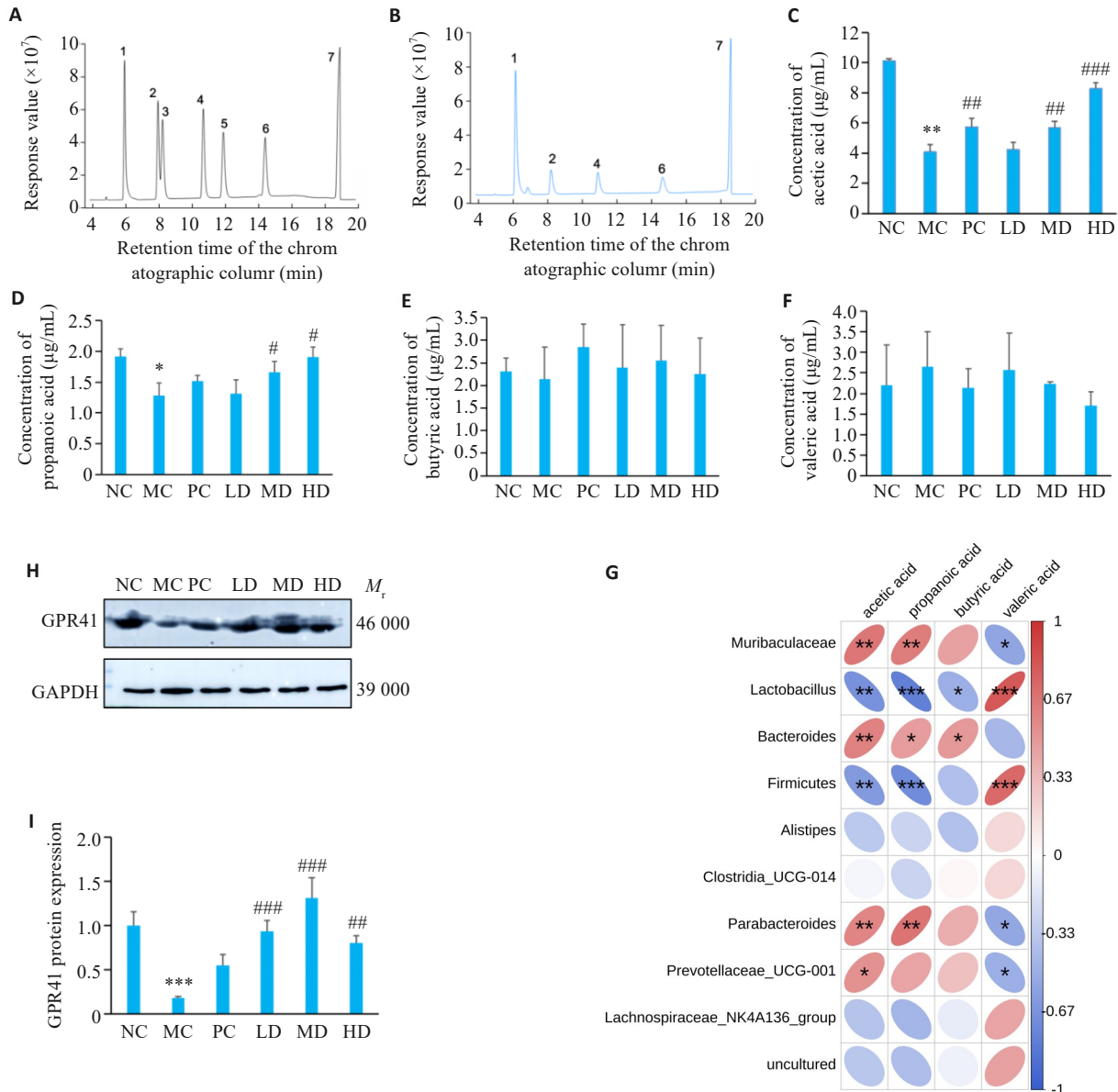


图5 PCP对CTX处理小鼠SCFAs含量的影响

Fig. 5 Effect of PCP on SCFAs content in CTX-treated mice. A: Standard curve of each component of SCFAs to be measured. B: GC chromatogram of mixed control solution of SCFAs (1: acetic acid; 2: propionic acid; 3: butyric acid; 4: isobutyric acid; 5: valeric acid; 6: isovaleric acid; 7: 2-ethylbutyric acid). C: Acetate levels. D: Propionate levels. E: Butyrate levels. F: Valerate levels. G: Correlation analysis between gut microbiota and short-chain fatty acids. H: Representative bands of GPR41. I: Protein expression of GPR41. Data are presented as Mean±SD (n=6). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs NC group; #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001 vs MC group.

胺诱导的小鼠免疫抑制和肠道损伤的作用及其机制,并通过粪菌移植实验验证肠道微生物在其中的关键作用。

肠黏膜是机体最大消化吸收场所,保护健康的重要屏障,也是肠道菌群的寄居地<sup>[30]</sup>。紧密连接蛋白是肠黏膜机械屏障的重要组成部分,可作为反映肠道通透性的

标志性指标,包括 Occludin、ZO-1、Claudin-1 等。当紧密连接蛋白的表达减少或上皮细胞受损时,肠道机械屏障会被破坏,导致肠道通透性增加,从而使有害的大分子和内毒素流入血液,最终导致一些疾病的发生<sup>[31]</sup>。肠上皮中的杯状细胞可以分泌粘蛋白MUC-2和组织蛋白

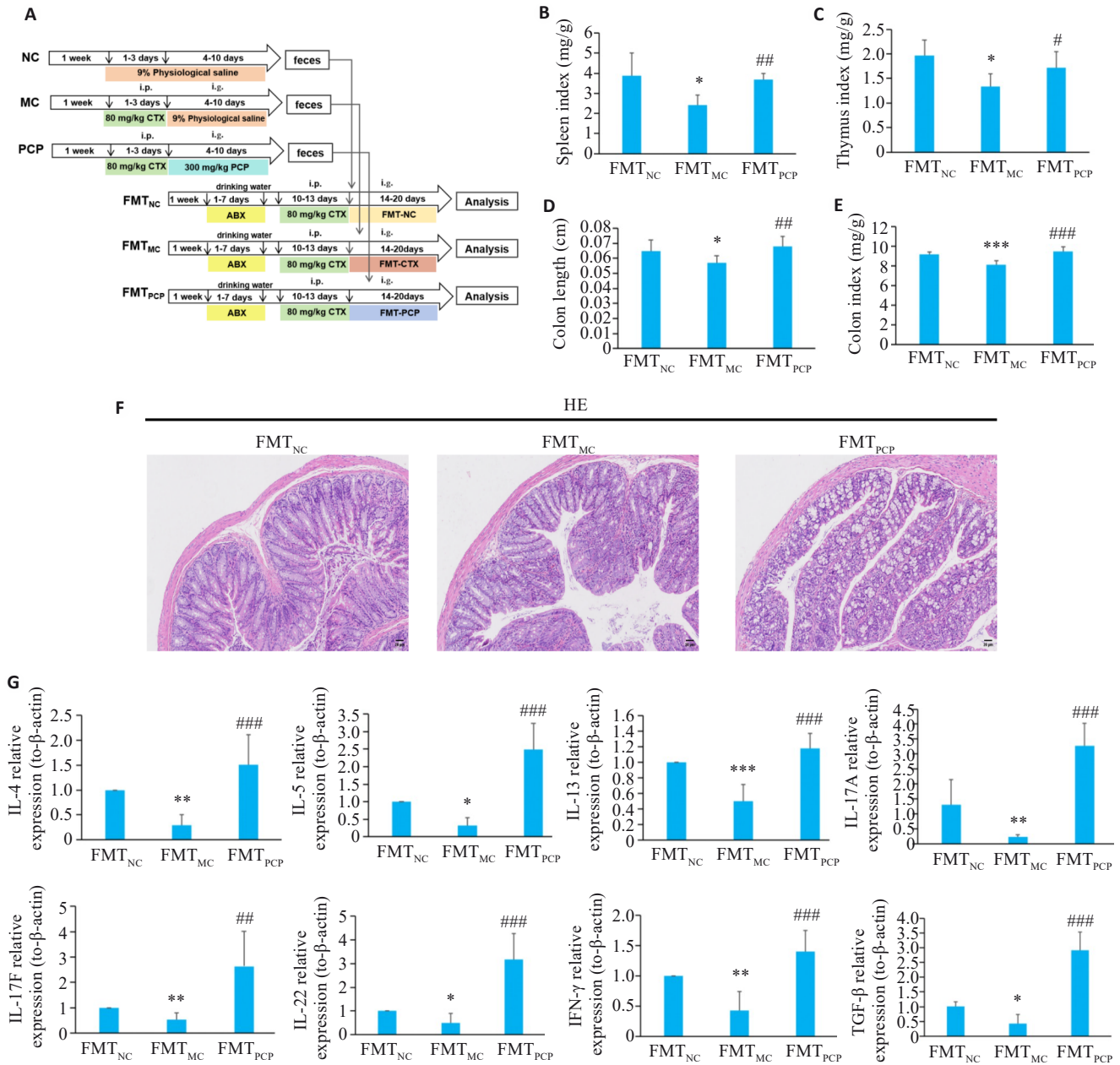


图6 FMT对CTX处理小鼠结肠生理状态的影响

Fig.6 Effect of FMT on colon injury in CTX-treated mice. A: Illustration of the design of fecal microbiota transplantation (FMT) experiment. B: Splenic somatic index (organ-to-body weight ratio). C: Thymus index (thymus weight/body weight). D: Colon length. E: Colon index (colon weight/body weight). F: HE staining ( $\times 100$ ). FMT<sub>NC</sub>: FMT normal group; FMT<sub>CTX</sub>: FMT CTX model group; FMT<sub>PCP</sub>: FMT-*Poria cocos* polysaccharide. G: FMT modulates immune function in CTX-treated mice (Relative mRNA expression levels of cytokines: IL-4, IL-5, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-22, IFN- $\gamma$ , and TGF- $\beta$ ). Data are presented as Mean $\pm$ SD (n=6). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs FMT<sub>NC</sub> group; #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001 vs FMT<sub>MC</sub> group.

酶,形成粘液层,阻止肠上皮与肠道中的微生物种群和代谢产物之间的直接相互作用<sup>[32]</sup>。环磷酰胺的使用会损害肠道屏障,出现杯状细胞减少和黏液分泌减少的情况<sup>[33]</sup>。本研究表明,PCP改善了肠道黏膜损伤,增加关键紧密连接成分ZO-1和Occludin表达,MUC2细胞因子的分泌,增加杯状细胞数,显著降低血清内毒素、D-乳酸和DAO水平。这些结果共同表明,PCP通过多种途径发挥肠道屏障保护作用,维持肠道稳态、减轻环磷酰胺诱导的肠道损伤。

在细胞因子网络方面,其对调节肠道黏膜屏障稳态

和细胞间免疫通讯至关重要<sup>[34]</sup>。细胞因子作为重要的调控分子,在协调肠道黏膜免疫中发挥着核心作用。环磷酰胺处理小鼠中,与Th2、Th17相关的多种细胞因子及IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ 表达显著降低,显示肠道黏膜免疫抑制;而PCP干预显著上调与Th1和Th2免疫反应相关的细胞因子表达,提示PCP可能通过调节Th1/Th2细胞因子产生,增强肠道黏膜免疫、促进稳态,这与生物活性多糖增强环磷酰胺诱导免疫抑制模型中肠道免疫的文献报道一致,即生物活性多糖在环磷酰胺诱导的免疫抑制模型中可增强肠道免疫<sup>[35]</sup>。研究结果表明,PCP可

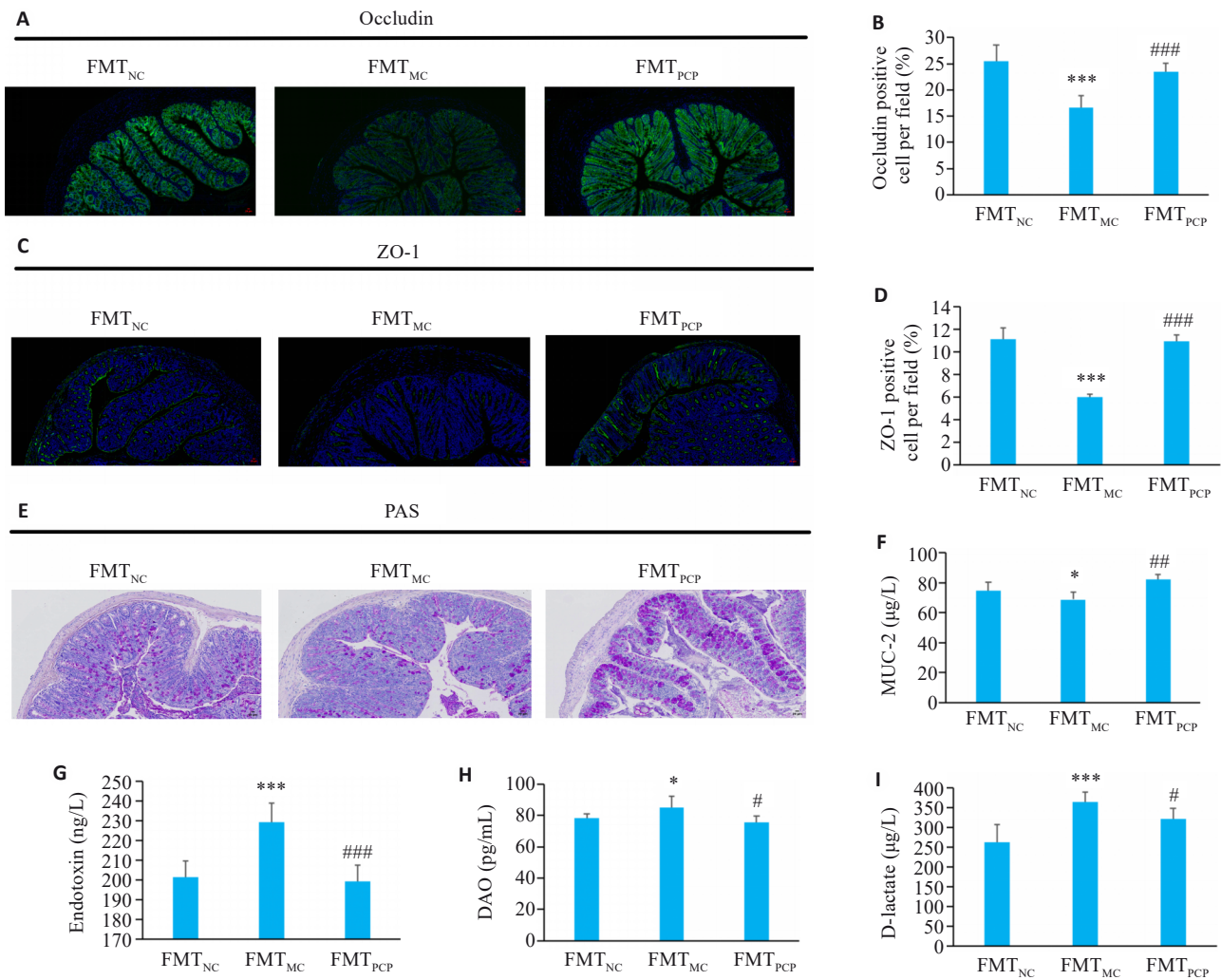


图7 FMT对小鼠结肠通透性的影响

Fig.7 Effect of FMT on intestinal permeability of the mice. A-D: Immunofluorescence staining of occludin and ZO-1. (green: Occludin and ZO-1; blue: nucleus; ×100). E: PAS staining showing mucus-secreting epithelial cells (×100). F: MUC2 content in colonic tissue. G: Endotoxin levels in serum. H: DAO levels in serum. I: D-Lactate levels in serum. Data are presented as Mean±SD (n=6). \*P<0.05, \*\*\*P<0.001 vs FMT<sub>NC</sub> group; #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001 vs FMT<sub>MC</sub> group.

能通过调节肠道黏膜内的免疫功能,保护小鼠免受环磷酰胺诱导的肠道黏膜损伤。

肠道微生物群在正常生理条件下保持相对平衡的状态,共同维护肠道和身体的健康。一旦肠道微生物群的平衡被破坏,将直接影响肠道微生物群结构和代谢行为,有害细菌将显著增加,对肠道和身体造成损害<sup>[36]</sup>。

本研究发现,在门水平上, *Bacteroidota* 和 *Firmicutes* 占据总菌群 90% 以上,PCP 可以显著增加 *Bacteroidota* 以及降低 *Firmicutes* 的丰富度,这与以往的研究结果一致<sup>[37]</sup>。在属水平上,PCP 处理后可以显著增加 *Muribaculaceae* 的相对丰度。研究表明, *Muribaculaceae* 可编码大量分解碳水化合物的酶,可降解各类复杂多糖,这可能是 PCP 能促进 *Muribaculaceae* 在肠道生长的原因。研究表明, *Muribaculaceae* 可能通过增加黏液蛋白基因的表达量和分泌再生,缓解结肠组织损伤并降低肠道通透性,代谢膳食纤维产生短链脂肪酸,与病原体竞争肠道黏液层的生态位和营养物质,抵

抗肠道致病菌的定殖等途径改善肠道屏障与免疫<sup>[38]</sup>。PCP 作为大分子多糖,提示 PCP 可能被 *Muribaculaceae* 降解为短链脂肪酸发挥作用。

大部分多糖不能在小肠内被消化或吸收,可能通过肠道菌群转化为 SCFAs。SCFAs 在调节免疫反应、维持上皮屏障功能、及作为肠上皮细胞能量来源方面发挥有效的作用<sup>[39-41]</sup>。实验数据表明,与 NC 相比,环磷酰胺处理的小鼠体内乙酸和丙酸浓度显著降低,而高剂量 PCP 治疗可显著逆转这一现象,乙酸和丙酸的水平显著升高。相一致的,相关性分析表明,产短链脂肪酸的 *Muribaculaceae* 与粪便中的乙酸和丙酸水平呈正相关。研究表明,乙酸和丙酸通过激活肠上皮细胞中的 GPR41 调节肠道免疫,增强肠道屏障功能<sup>[42]</sup>,我们研究发现 PCP 以剂量依赖的方式激活 GPR41 受体。这些结果表明,PCP 可能通过微生物群依赖的机制增强 SCFAs 的生物合成,从而激活肠道上皮细胞中的 GPR41,增强肠道黏膜免疫,从而减轻环磷酰胺诱导的肠道损伤。

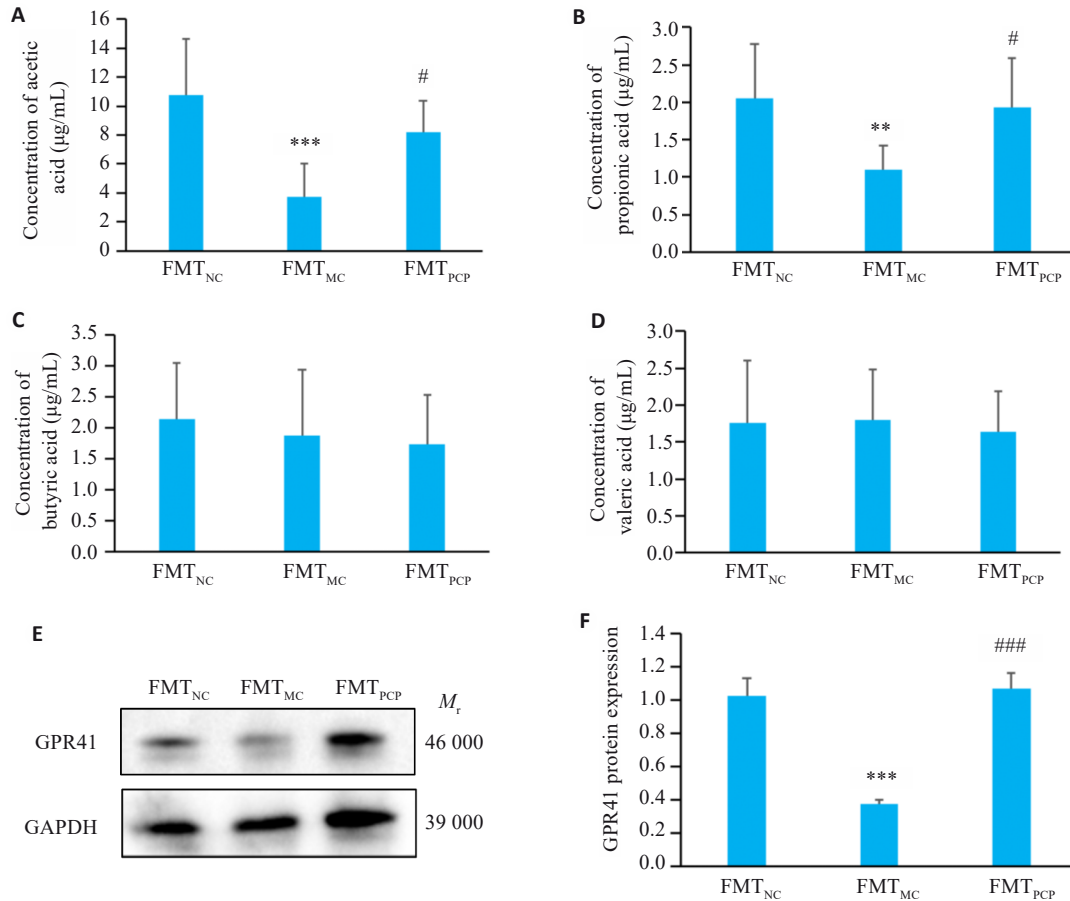


图8 FMT对小鼠结肠SCFAs含量和GPR41的影响

Fig. 8 Effect of FMT on SCFAs content and GPR41 in the colon of the mice. **A:** Acetate. **B:** Propionate. **C:** Butyrate. **D:** Valerate concentrations. **E:** Representative bands of GPR41. **F:** Quantitative analysis of GPR41 protein expression normalized to  $\beta$ -actin. Data are presented as *Mean* $\pm$ *SD* ( $n=6$ ). \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs FMT<sub>NC</sub> group; # $P<0.05$ , ### $P<0.001$  vs FMT<sub>MC</sub> group.

综上所述,本研究结果表明,PCP可能通过增加 *Muribaculaceae* 的相对丰度,促进乙酸和丙酸的生产,激活 GPR41 蛋白增强肠道黏膜免疫,从而减轻 CTX 诱导的小鼠肠道黏膜损伤。然而,本研究是在 CTX 给药的特定背景下进行的,而非针对肠道毒性的一般模型。由于 CTX 主要用于癌症、自身免疫性疾病和免疫介导的疾病等特定情况,因此在涉及癌症或癌症治疗的模型中评估 PCP 的效果,将更具临床相关性。此外,在未来的研究中,在属水平的研究基础上,我们将重点筛选 PCP 调节的具体菌种,揭示 PCP 调节肠道微生物的具体机制及其结构基础。总体而言,本研究强调了 PCP 在缓解化疗引起的肠道损伤和改善整体肠道健康方面的潜力。这些发现为探索膳食多糖(如 PCP)作为功能性食品和治疗剂在临床应用中的潜力提供了坚实的理论基础。

**Declaration of interests:** The authors declare no competing interests.

#### 参考文献:

[1] Chu Q, Zhang YR, Chen W, et al. *Apios americana* Medik flowers polysaccharide (AFP) alleviate Cyclophosphamide-induced immunosuppression in ICR mice[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 144:

829-36.

- [2] Day W, Gabriel C, Kelly RE, et al. Juvenile dermatomyositis resembling late-stage Degos disease with gastrointestinal perforations successfully treated with combination of cyclophosphamide and rituximab: case-based review[J]. *Rheumatol Int*, 2020, 40(11): 1883-90.
- [3] Viaud S, Saccheri F, Mignot G, et al. The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide[J]. *Science*, 2013, 342(6161): 971-6.
- [4] Allaire JM, Crowley SM, Law HT, et al. The intestinal epithelium: central coordinator of mucosal immunity[J]. *Trends Immunol*, 2018, 39(9): 677-96.
- [5] Chistiakov DA, Bobryshev YV, Kozarov E, et al. Intestinal mucosal tolerance and impact of gut microbiota to mucosal tolerance[J]. *Front Microbiol*, 2015, 5: 781.
- [6] Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability[J]. *Gut*, 2009, 58(8): 1091-103.
- [7] Yang WJ, Yu TM, Huang XS, et al. Intestinal microbiota-derived short-chain fatty acids regulation of immune cell IL-22 production and gut immunity[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4457.
- [8] Kayama H, Okumura R, Takeda K. Interaction between the microbiota, epithelia, and immune cells in the intestine[J]. *Annu*

- Rev Immunol, 2020, 38: 23-48.
- [9] 聂文律, 王东鹏, 钟丽姣, 等. 麸炒苍术精制多糖通过调节亚油酸代谢改善环磷酰胺诱导的小鼠免疫抑制与肠道损伤[J/OL]. 中国中药杂志, 1-14 [2025-10-15]. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjmm.20250612.301>.
- [10] 郭林霞, 马可为, 冯志华, 等. 枣多糖提取物对环磷酰胺所致的蛋鸡肠黏膜免疫屏障功能下降的缓解作用[J]. 中国兽医学报, 2022, 42(1): 107-13.
- [11] Xu TR, Zhang HM, Wang SG, et al. A review on the advances in the extraction methods and structure elucidation of *Poria cocos* polysaccharide and its pharmacological activities and drug carrier applications[J]. Int J Biol Macromol, 2022, 217: 536-51.
- [12] Zhao MH, Guan ZY, Tang N, et al. The differences between the water- and alkaline-soluble *Poria cocos* polysaccharide: a review[J]. Int J Biol Macromol, 2023, 235: 123925.
- [13] Jiang YH, Wang L, Chen WD, et al. *Poria cocos* polysaccharide prevents alcohol-induced hepatic injury and inflammation by repressing oxidative stress and gut leakiness[J]. Front Nutr, 2022, 9: 963598.
- [14] Duan YT, Huang JJ, Sun MJ, et al. *Poria cocos* polysaccharide improves intestinal barrier function and maintains intestinal homeostasis in mice[J]. Int J Biol Macromol, 2023, 249: 125953.
- [15] Sun MJ, Yao L, Yu QM, et al. Screening of *Poria cocos* polysaccharide with immunomodulatory activity and its activation effects on TLR4/MD2/NF- $\kappa$ B pathway[J]. Int J Biol Macromol, 2024, 273(Pt 1): 132931.
- [16] 房悦, 黄佳静, 张越, 等. 基于BTLA/HVEM通路研究茯苓多糖对免疫抑制小鼠的免疫调节作用[J]. 中南药学, 2025, 23(5): 1183-9.
- [17] 王灿红, 霍小位, 何晓山, 等. 羧甲基茯苓多糖对肠癌小鼠生命延长及对环磷酰胺的减毒作用[J]. 食品科学, 2016, 37(21): 229-33.
- [18] Cheng Y, Xie Y, Ge JC, et al. Structural characterization and hepatoprotective activity of a galactoglucan from *Poria cocos*[J]. Carbohydr Polym, 2021, 263: 117979.
- [19] Wang J, Li MH, Gao YW, et al. Effects of exopolysaccharides from *Lactiplantibacillus plantarum* JLAU103 on intestinal immune response, oxidative stress, and microbial communities in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice[J]. J Agric Food Chem, 2022, 70(7): 2197-210.
- [20] Wu ZH, Huang SM, Li TT, et al. Gut microbiota from green tea polyphenol-dosed mice improves intestinal epithelial homeostasis and ameliorates experimental colitis[J]. Microbiome, 2021, 9(1): 184.
- [21] Chang CJ, Lin CS, Lu CC, et al. *Ganoderma lucidum* reduces obesity in mice by modulating the composition of the gut microbiota[J]. Nat Commun, 2015, 6: 7489.
- [22] Jädert C, Phillipson M, Holm L, et al. Preventive and therapeutic effects of nitrite supplementation in experimental inflammatory bowel disease[J]. Redox Biol, 2013, 2: 73-81.
- [23] Mao XM, Wu S, Huang DD, et al. Complications and comorbidities associated with antineoplastic chemotherapy: Rethinking drug design and delivery for anticancer therapy[J]. Acta Pharm Sin B, 2024, 14(7): 2901-26.
- [24] Chen L, Wang D, Liu W, et al. Immunomodulation of exopolysaccharide produced by *Lactocaseibacillus rhamnosus* ZFM216 in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice by modulating gut microbiota[J]. Int J Biol Macromol, 2024, 283(Pt 2): 137619.
- [25] Xue HK, Liang BM, Wang Y, et al. The regulatory effect of polysaccharides on the gut microbiota and their effect on human health: a review[J]. Int J Biol Macromol, 2024, 270(Pt 2): 132170.
- [26] Ying MX, Yu Q, Zheng B, et al. Cultured *Cordyceps sinensis* polysaccharides modulate intestinal mucosal immunity and gut microbiota in cyclophosphamide-treated mice[J]. Carbohydr Polym, 2020, 235: 115957.
- [27] Zhu ZP, Luo YR, Lin LT, et al. Modulating effects of turmeric polysaccharides on immune response and gut microbiota in cyclophosphamide-treated mice[J]. J Agric Food Chem, 2024, 72(7): 3469-82.
- [28] Li N, Wang D, Wen XJ, et al. Effects of polysaccharides from *Gastrodia elata* on the immunomodulatory activity and gut microbiota regulation in cyclophosphamide-treated mice[J]. J Sci Food Agric, 2023, 103(7): 3390-401.
- [29] Wang DP, Dong Y, Xie Y, et al. *Atractylodes lancea* rhizome polysaccharide alleviates immunosuppression and intestinal mucosal injury in mice treated with cyclophosphamide[J]. J Agric Food Chem, 2023.
- [30] Chopyk DM, Grakoui A. Contribution of the intestinal microbiome and gut barrier to hepatic disorders[J]. Gastroenterology, 2020, 159(3): 849-63.
- [31] Buckley A, Turner JR. Cell biology of tight junction barrier regulation and mucosal disease[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018, 10(1): a029314.
- [32] Nyström EEL, Martinez-Abad B, Arike L, et al. An intercrypt subpopulation of goblet cells is essential for colonic mucus barrier function[J]. Science, 2021, 372(6539): eabb1590.
- [33] Gustafsson JK, Johansson MEV. The role of goblet cells and mucus in intestinal homeostasis[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2022, 19(12): 785-803.
- [34] Pizarro TT, Dinarello CA, Cominelli F. Editorial: cytokines and intestinal mucosal immunity[J]. Front Immunol, 2021, 12: 698693.
- [35] Wu XC, Huang XJ, Ma WN, et al. Bioactive polysaccharides promote gut immunity via different ways[J]. Food Funct, 2023, 14(3): 1387-400.
- [36] Knox NC, Forbes JD, Peterson CL, et al. The gut microbiome in inflammatory bowel disease: lessons learned from other immune-mediated inflammatory diseases[J]. Am J Gastroenterol, 2019, 114(7): 1051-70.
- [37] Fu YP, Feng B, Zhu ZK, et al. The polysaccharides from *Codonopsis pilosula* modulates the immunity and intestinal microbiota of cyclophosphamide-treated immunosuppressed mice[J]. Molecules, 2018, 23(7): 1801.
- [38] Zhu YQ, Chen BR, Zhang XY, et al. Exploration of the *Muribaculaceae* family in the gut microbiota: diversity, metabolism, and function[J]. Nutrients, 2024, 16(16): 2660.
- [39] Wastyk HC, Fragiadakis GK, Perelman D, et al. Gut-microbiota-targeted diets modulate human immune status[J]. Cell, 2021, 184(16): 4137-53. e14.
- [40] Han F, Wang Y, Han YY, et al. Effects of whole-grain rice and wheat on composition of gut microbiota and short-chain fatty acids in rats[J]. J Agric Food Chem, 2018, 66(25): 6326-35.
- [41] Wang H, Li ML, Jiao FR, et al. Soluble dietary fibers from solid-state fermentation of wheat bran by the fungus *Cordyceps cicadae* and their effects on colitis mice[J]. Food Funct, 2024, 15(2): 516-29.
- [42] de Vos WM, Tilg H, Van Hul M, et al. Gut microbiome and health: mechanistic insights[J]. Gut, 2022, 71(5): 1020-32.