

## 参苓白术散和理中汤对AAD动物模型肠道 产丁酸菌群多样性变化的影响

毛梦琳, 林萍, 熊林林, 封勇, 舒青龙\*

(江西中医药大学 中学院, 南昌 330004)

**[摘要]** 目的: 基于肠道产丁酸菌群多样性变化, 研究参苓白术散和理中汤治疗抗生素相关性腹泻(AAD)微生态机制。方法: 将SD大鼠随机分为参苓白术散汤剂治疗组(SPS)和理中汤汤剂治疗组(LPT), 灌胃盐酸克林霉素(315 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)建立菌群紊乱模型, 灌胃致病菌艰难梭菌构建AAD模型, 分别予以参苓白术散汤剂(5.5 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)和理中汤汤剂(5.5 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)进行治疗, 收集不同阶段粪便样本, 提取粪便总DNA, 利用丁酰辅酶A-辅酶A转移酶基因引物进行聚合酶链式反应(PCR)扩增, 再对PCR产物进行克隆测序, 分析产丁酸菌群多样性响应。结果: 治疗后两组大鼠饮食逐渐增加, 粪便成形, 被毛光泽和顺滑度增加, 活动量增加, 灵敏度提高。以丁酰辅酶A-辅酶A转移酶基因为分子标记的扩增分别获得SPS 297条序列, LPT 300条序列确定为产丁酸菌群多样性结果, SPS正常阶段、造模阶段、治疗阶段分别获得98, 100, 99条产丁酸菌序列, 分别属于8, 3, 6个运算分类单位(OTU), 相似性范围分别为78%~97%, 86%~99%, 81%~97%, 治疗后OTU数量恢复至正常阶段的75%; LPT正常阶段、造模阶段、治疗阶段均获得100条产丁酸菌序列, 分别属于6, 2, 4个OTU, 相似性范围为83%~97%, 92%~99%, 85%~99%, 治疗后OTU数量恢复至正常阶段的80%。产丁酸菌均存在于两组大鼠的所有阶段, 都以厚壁菌门产丁酸菌为主, 占总数量98%以上。SPS在属水平对产丁酸菌菌群的影响主要集中在*Clostridium*属丰度显著降低, *Eubacterium*属丰度显著升高。LPT主要集中在*Roseburia*属, 并且增加了*Eubacterium*属, *Lacrimispora*属和*Clostridium*属的丰度。根据系统发育树结果, SPS治疗后, 产丁酸菌菌群的分布由造模后的5个cluster增加到治疗后的7个cluster; LPT分布由造模后的3个Cluster增加到治疗后的9个Cluster。结论: 参苓白术散和理中汤治疗AAD病过程中, 能够调节肠道产丁酸菌的结构和丰度, 恢复产丁酸菌菌群多样性, 改善肠道微生态环境失稳状况。

**[关键词]** 参苓白术散; 理中汤; 肠道菌群; 产丁酸菌; 抗生素相关性腹泻

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)22-0023-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20212106

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20210925.0017.001.html>

**[网络出版日期]** 2021-09-28 8:50

### Changes in Diversity of Intestinal Butyrate-producing Bacteria During Treatment with Shenling Baizhusan and Lizhongtang in Animal Model of AAD

MAO Meng-lin, LIN Ping, XIONG Lin-lin, FENG Yong, SHU Qing-long\*

(College of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the microecological mechanisms of Shenling Baizhusan (SLBZ) and Lizhongtang (LZ) in treating antibiotic-associated diarrhea (AAD) based on changes in the diversity of intestinal butyrate-producing bacteria. **Method:** SD rats were randomly divided into an SLBZ group (5.5 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) and an LZ group (5.5 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>). The gut microbiota disturbance model was induced by intragastric administration of clindamycin hydrochloride (315 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) and AAD model by *Clostridium*

**[收稿日期]** 20210711(003)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(82160788);江西省教育厅科技项目(GJJ180689)

**[第一作者]** 毛梦琳, 在读硕士, 从事中医药微生态研究, E-mail: alinamao926@163.com

**[通信作者]** \*舒青龙, 教授, 从事中医药微生态研究, E-mail: shuqinglong@126.com

*difficile*. Subsequently, the rats were treated correspondingly. Fecal samples at different stages were collected and the total DNA was extracted. Polymerase chain reaction (PCR) amplification was performed with the primers of butyryl coenzyme A (CoA)-CoA transferase genes. The PCR products were cloned and sequenced to analyze the diversity response of butyrate-producing bacteria. **Result:** After treatment, both groups showed increased food uptake, formed feces, glossy and smooth fur, and improved activity and sensitivity. With the butyryl CoA-CoA transferase gene as the molecular marker, 297 sequences of butyrate-producing bacteria in the SLBZ group (SPD for short) and 300 sequences of butyrate-producing bacteria in the LZ group (LPD for short) were obtained. In the SLBZ group, 98, 100, and 99 sequences of SPD were obtained at the normal stage, the modeling stage, and the treatment stage, respectively, belonging to 8, 3, and 6 operational taxonomic units (OTUs), with similarity ranges of 78%-97%, 86%-99%, and 81%-97%. The number of OTUs recovered to 75% of the normal level after treatment. In the LZ group, 100 sequences of LPD were obtained at the normal stage, the modeling stage, and the treatment stage, respectively, belonging to 6, 2, and 4 OTUs, with similarity ranges of 83%-97%, 92%-99%, and 85%-99%. The number of OTUs recovered to 80% of the normal level after treatment. Butyrate-producing bacteria were present in all stages of the two groups, dominated by Firmicutes, accounting for more than 98% of the total number. The effects of SLBZ on SPD at the genus level were observed in the significant decrease in *Clostridium* abundance and the significant increase in *Eubacterium* abundance. The effect of LZ on LPD was mainly concentrated on the *Roseburia* at the genus level, and LZ also increased the abundance of *Eubacterium*, *Lacrimispora*, and *Clostridium*. According to the phylogenetic tree, the classification of butyrate-producing bacteria increased from five clusters to seven clusters after SLBZ treatment, while that increased from three clusters to nine clusters after LZ treatment. **Conclusion:** In the treatment of AAD, SLBZ and LZ can regulate the structure and abundance of butyrate-producing bacteria in the intestine, restore their diversity, and improve the instability of the intestinal microecological environment.

**[Keywords]** Shenling Baizhusan; Lizhongtang; gut microbiota; butyrate-producing bacteria; antibiotic-associated diarrhea

抗生素相关性腹泻(AAD)是长期应用广谱抗生素,在抑制或杀死致病菌的同时,改变人体内正常肠道菌群丰度和组成,进一步导致肠道菌群功能障碍而引起的腹泻<sup>[1-3]</sup>。抗生素的使用破坏肠道菌群的稳态,是引起腹泻的主要原因之一<sup>[4]</sup>。可能通过不同的机制导致腹泻,包括渗透性腹泻(通过肠道细菌吸收短链脂肪酸的损失),以及分泌毒素的艰难梭菌的定植和过度生长<sup>[5]</sup>。目前抗生素在临床治疗中的广泛应用,导致与抗生素使用相关的腹泻发病率逐渐上升<sup>[6]</sup>。临床常使用益生菌制剂<sup>[7-8]</sup>和粪菌移植<sup>[9]</sup>预防治疗AAD,但疗效均不够理想。

中医认为抗生素性多苦寒,能清热解毒,过量、长期使用导致脾胃损伤,运化功能失常,而出现腹泻<sup>[10]</sup>。腹泻在中医属“泄泻”范畴,病机为脾失健运,气机失调,清浊不分<sup>[11]</sup>,治法以益气健脾为主。参苓白术散出自《太平惠民合剂局方》,具有健脾益气、渗湿止泻等功效;理中汤首见于《伤寒杂病论》,功效为温中散寒、补益脾胃、调理中焦<sup>[12]</sup>。张广玉等<sup>[13]</sup>,运用参苓白术散加减治疗AAD在临床上取

得一定疗效。研究提示,理中汤具有改善肠道菌群结构、增加菌群多样性的作用<sup>[14]</sup>。参苓白术散、理中汤等方药均为针对AAD脾虚之本的经典复方,也是现在临床上治疗AAD的常用方<sup>[15]</sup>。

产丁酸菌是按功能分类的以最终代谢产物为丁酸作为分类标准的细菌,产丁酸菌主要分布在厚壁菌门<sup>[16]</sup>。在一项AAD研究中显示抗生素的使用与肠道菌群多样性的变化明显有关,包括产丁酸菌的数量显著降低<sup>[17]</sup>。产丁酸菌主要通过丁酸激酶途径和丁酰-辅酶A:乙酰-辅酶A转移酶途径生成丁酸。产丁酸菌的主要代谢产物丁酸不仅能改变肠道pH环境,抑制病原菌生长,同时丁酸对维护肠道上皮屏障的健康至关重要<sup>[18]</sup>,因此,恢复产丁酸菌数量对治疗AAD至关重要。LOUIS等<sup>[19]</sup>研究肠道产丁酸菌利用丁酰辅酶A-辅酶A转移酶产生丁酸,可靶向用于肠道中主要的产丁酸菌菌群的检测,由此利用丁酰辅酶A-辅酶A转移酶基因为生物标记检测肠道产丁酸菌菌群结构。目前大多数研究只是基于16S rRNA检测肠道菌群结构变化,进

而阐述治疗AAD的微生态过程<sup>[20-21]</sup>,鲜有对于肠道菌群中调节某种特定功能菌群的相关研究,如产丁酸菌这类维持肠道上皮屏障健康的重要功能菌群。据此,本实验通过参苓白术散和理中汤模拟治疗动物模型的AAD,主要以治疗AAD过程中大鼠肠道产丁酸菌群多样性变化为研究对象,旨在从功能菌群角度研究中医药治疗AAD的微生态机制提供参考。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级SD大鼠,雌性,体质量200±20g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司(合格证号43004700031121),所有动物实验经江西中医药大学实验动物伦理委员会批准后,批号JZLLSC20210019。饲养于江西中医药大学中医学研究院科研实验中心,饲养条件为室温(22±2)℃,相对湿度50%~70%,噪声、明暗循环的环境中,并自由摄食和饮水。

**1.2 药材** 理中汤(白术、干姜、党参、炙甘草,质量比为1:1:1:1,购于江西中医药大学附属医院,批号分别为2002005,19041103,191002,19051301),参苓白术散(莲子、薏苡仁、砂仁、桔梗、白扁豆、茯苓、党参、炙甘草、白术、山药,质量比为2:2:2:2:3:4:4:4:4:4,购于江西中医药大学附属医院,批号分别为190302,19080801,180701,181202,19071201,190302,191002,19051301,2002005,190402),由江西中医药大学中医学研究院科研实验中心董德刚副教授鉴定为正品。药物分2次煎煮,首次加入10倍量水浸泡30min,武火煮开后文火煎煮30min取滤液,留药渣;第2次加入8倍量水至药渣中,武火煮开后文火煎煮30min取滤液,弃药渣。将2次煎煮药液合并,浓缩药汁质量浓度至含生药量1.0g·mL<sup>-1</sup>的水煎剂,放置于4℃冰箱中备用。

**1.3 菌株** 艰难梭菌*Clostridium difficile* SH186和艰难梭菌*C. difficile* SH182(由复旦大学赠送),艰难梭菌*C. difficile* NC-1和艰难梭菌*C. difficile* NC-2(由中国疾病预防控制中心赠送)。

**1.4 试剂** BHI液体培养基(英国Oxoid公司,批号2185845),盐酸克林霉素[生物工程(上海)有限公司,批号130422-201306],胃膜素(上海麦克林生化科技有限公司,批号191002);无菌生理盐水,粪便DNA提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,批号Q4204];聚合酶链式反应(PCR)引物(PAGE纯化)[生物工程(上海)有限公司];DEPC水(美国赛默飞世尔科技公司,批号20200906);微量离心管

(赛国生物科技有限责任公司,批号20200305);各型号tips,Taq酶,Loading buffer[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号分别为20210304,AK71033A,N2522];电泳缓冲液(北京索莱宝科技有限公司,批号20190404)。

**1.5 仪器** QL-861型旋涡振荡器(上海青浦沪西仪器厂),SW-CJ-2D型超净工作台(苏州净化设备有限公司),Mark II型厌氧工作站(荷兰Mark公司),SPX-150B-Z型生化培养箱(上海光都仪器设备有限公司),Neofuge 13R型台式高速冷冻离心机[力新仪器(上海)有限公司],EDC-810型普通PCR仪(德国耶拿仪器公司),NanoDrop 5000型微量分光光度计[赛默飞世尔科技(中国)有限公司],Mini Pro 300V Power Supply型电泳仪(美国Major Science公司),Sub System 70型电泳槽(美国Labnet公司),BD-III型凝胶成像仪(美国BD公司),BHC-1300IIA型生物安全柜(苏州净化设备有限公司),DYY-2C型电泳仪(北京六一生物科技有限公司)。

## 2 方法

**2.1 AAD模型构建和治疗** 将大鼠以蒸馏水及标准饲料饲养1周以适应环境(正常阶段)后,分为参苓白术散汤剂治疗组(SPS)和理中汤汤剂治疗组(LPT)进行造模,造模成功后分别使用参苓白术散汤剂(5.5g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)和理中汤汤剂(5.5g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)治疗<sup>[22]</sup>。对20只大鼠予以高剂量盐酸克林霉素(315mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,相当于正常用量的8倍)对大鼠进行灌胃1周构建菌群紊乱模型,停止抗生素灌胃后,灌以致病菌艰难梭菌培养后混合液1周(BHI培养37℃恒温厌氧培养12h后混合,混合菌液密度8×10<sup>7</sup>CFU·mL<sup>-1</sup>)构建AAD模型,为了增强艰难梭菌在肠道内的定植,艰难梭菌灌胃同时予以胃膜素(420mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)灌胃<sup>[22]</sup>,直至实验动物出现腹泻症状,AAD模型构建完成(AAD建模阶段)。进入治疗阶段,分别予以参苓白术散汤剂和理中汤汤剂进行治疗,治疗周期为2周(治疗阶段)<sup>[22]</sup>。

**2.2 粪便样品采集及细菌总DNA提取** 参苓白术散汤剂组取样阶段分别为正常阶段(SPS1),AAD建模阶段(SPS2),治疗阶段(SPS3);理中汤汤剂组取样阶段分别为正常阶段(LPT1),AAD建模阶段(LPT2),治疗阶段(LPT3)。将采集后粪便样品置于-20℃保存。对所采集的大鼠粪便,通过粪便DNA提取试剂盒提取粪便中的细菌总DNA,并通过1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组DNA质量。

**2.3 丁酰辅酶A-辅酶A转移酶基因PCR扩增、测序及数据分析** 使用丁酰辅酶A-辅酶A转移酶基因引物 BCoATscrF (5'-GCIGAICATTTTCACITGGAAYWSITGGCAYATG-3') 和 BCoATscrR (5'-CCTGCCTTTGCAATRTCIACRAANGC-3') (引物扩增长度约为530 bp)对提取的粪便DNA基因进行PCR扩增。反应条件为94℃预变性40 s;94℃变性40 s,56℃退火45 s,72℃延伸30 s,共35个循环;72℃后延伸10 min。对PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳检测,纯化产物。使用M13引物进行PCR扩增,构建克隆文库,筛选克隆,随后上机测序(ABI3730xl自动测序仪)。在美国国家生物技术信息中心(NCBI)(www.ncbi.nlm.nih.gov)上对测序结果进行比对。

**2.4 产丁酸菌群进化树构建** 根据分类学分析的结果,得到不同分组在各分类水平(如域、界、门、纲、目、科、属等)上的群落结构组成情况,通过计算并绘制百分图能够更直观地了解各样本在某一分类学水平上含有何种微生物和各个样本中各类微生物所占百分比。

根据序列运算分类单位(OTU)相似性,选取每个丁酰辅酶A-辅酶A转移酶基因序列文库的代表序列,通过MEGA7.0程序采用邻接法(NJ)构建系统发育树,本文中的参考序列引自GenBank数据库,线段表示2%序列差异的分支长度。将所得样本序列在NCBI网站上进行比对,根据比对结果挑选部分序列及其参考序列,将所挑选序列及其参考序列导入已存在的进化树中,并进行优化处理。

### 3 结果

**3.1 参苓白术散和理中汤对AAD模型构建及治疗表型变化的影响** 经过14 d造模,AAD模型构建成功。正常阶段,大鼠始终表现为反应灵敏,活动及饮食量正常,被毛柔顺有光泽,粪便呈棕褐色颗粒状;建模阶段,大鼠出现少食,蜷卧,腹胀,肛周污秽,粪便稀软不成形,被毛稀疏干枯,动作迟缓;治疗阶段,SPS和LPT大鼠饮食均逐渐增加,粪便均成形,为棕色颗粒状,被毛光泽和顺滑度均增加,活动量增加,灵敏度提高。

**3.2 丁酰辅酶A-辅酶A转移酶PCR扩增及测序结果** SPS的3个样品SPS1,SPS2,SPS3,均获得丁酰辅酶A-辅酶A转移酶基因扩增结果;对以上3个样品的丁酰辅酶A-辅酶A转移酶基因PCR扩增片段构建文库并测序,均获得100条测序序列。这些序列经NCBI比对,SPS1的99条测序序列,SPS2的

100条测序序列,SPS3的98条测序序列确定为丁酰辅酶A-辅酶A转移酶基因,分别属于8个OTU,3个OTU,6个OTU,相似性范围为78%~97%,86%~99%,81%~97%。其中,样品SPS1的1条测序序列,SPS3的2条测序序列确定为其他序列。LPT的3个样品LPT1,LPT2,LPT3,均获得丁酰辅酶A-辅酶A转移酶基因扩增结果;对以上3个样品的丁酰辅酶A-辅酶A转移酶基因PCR扩增片段构建文库并测序,均获得100条测序序列。这些序列经NCBI比对,均可确定为丁酰辅酶A-辅酶A转移酶基因,分别属于6个OTU,2个OTU,4个OTU,相似性分别在83%~97%,92%~99%,85%~99%。

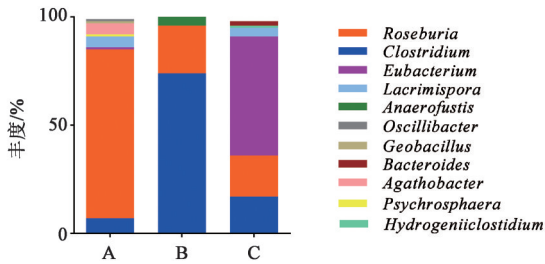
### 3.3 SPS产丁酸菌变化结果

**3.3.1 产丁酸菌门水平变化结果** 产丁酸菌在正常阶段SPS1,建模阶段SPS2及治疗阶段SPS3均存在,SPS1,SPS2,SPS3三个阶段都以厚壁菌门产丁酸菌为主,占总数量98%以上,其中SPS1还存在少量的变形杆菌门,占总数1%;SPS2只存在厚壁菌门;SPS3出现拟杆菌门,占总数2%。

**3.3.2 产丁酸菌属水平变化结果** 动物实验参苓白术散治疗AAD病过程中,属水平主要分布在梭菌属(*Clostridium*),罗氏菌属(*Roseburia*),真杆菌属(*Eubacterium*),厌氧棒形菌属(*Anaerofustis*),泪滴形孢子属(*Lacrimispora*),*Hydrogeniiclostidium*,冷球菌属(*Psychrosphaera*),阴沟杆菌属(*Agathobacter*),拟杆菌属(*Bacteroides*),芽孢杆菌属(*Geobacillus*),颤杆菌属(*Oscillibacter*),瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)。各阶段肠道产丁酸菌的多样性变化见图1,数据显示,正常喂养阶段以*Roseburia*属数量最多,占80%,其次为*Clostridium*,占7%,*Lacrimispora*和*Agathobacter*均占5%,*Eubacterium*,*Psychrosphaera*,*Geobacillus*和*Oscillibacter*各占1%,共8个属;建模阶段SPS2阶段,减少到只有3种属,以*Clostridium*数量最多,占74%,其次是*Roseburia*,占22%,*Anaerofustis*占4%;治疗阶段,属的种类逐渐恢复到6个,以*Eubacterium*数量最多,占57%,*Clostridium*占19%,*Roseburia*占17%,*Lacrimispora*占4%,*Bacteroides*占2%,*Hydrogeniiclostidium*最少,占1%。SPS3与SPS1属结构的不同,或与肠道产丁酸菌对底物偏嗜有关。

### 3.4 LPT产丁酸菌变化结果

**3.4.1 产丁酸菌门水平变化结果** 产丁酸菌在正常阶段LPT1,建模阶段LPT2及治疗阶段LPT3均存在,3个阶段均为厚壁菌门产丁酸菌。



A. SPS1; B. SPS2; C. SPS3(图2同)

图1 参苓白术散治疗AAD大鼠过程肠道产丁酸菌菌群属水平结构变化

Fig. 1 Horizontal structure of intestinal butyrate producing bacteria in aad rats treated with Shenling Baizhusan

**3.4.2 产丁酸菌属水平变化结果** 理中汤治疗AAD病过程中,产丁酸菌菌群在属水平主要分布在 *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Roseburia*, *Eubacterium*, *Oscillibacter*, *Lacrimispora*。各阶段肠道产丁酸菌菌群的多样性变化见图2,数据显示,正常喂养阶段以 *Clostridium* 数量最多,占43%,*Roseburia* 次之,占35%,*Eubacterium* 占17%,*Ruminococcus* 和 *Oscillibacter*, 分别占3%和2%,一共5个属;建模阶段LPT2阶段,减少到只有1种属,为 *Roseburia*;治疗阶段,属的种类逐渐恢复到4个,以 *Roseburia* 数量最多,占96%,其次是 *Clostridium*, 占2%,*Lacrimispora* 和 *Eubacterium* 各占1%。见图2。

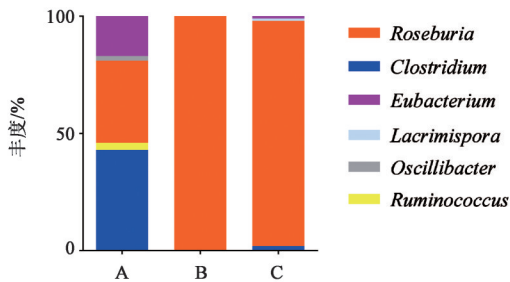


图2 理中汤治疗AAD大鼠过程肠道产丁酸菌菌群属水平结构变化

Fig. 2 Horizontal structure of intestinal butyrate producing bacteria in aad rats treated with Lizhongtang

### 3.5 AAD大鼠肠道产丁酸菌菌群系统发育树构建结果

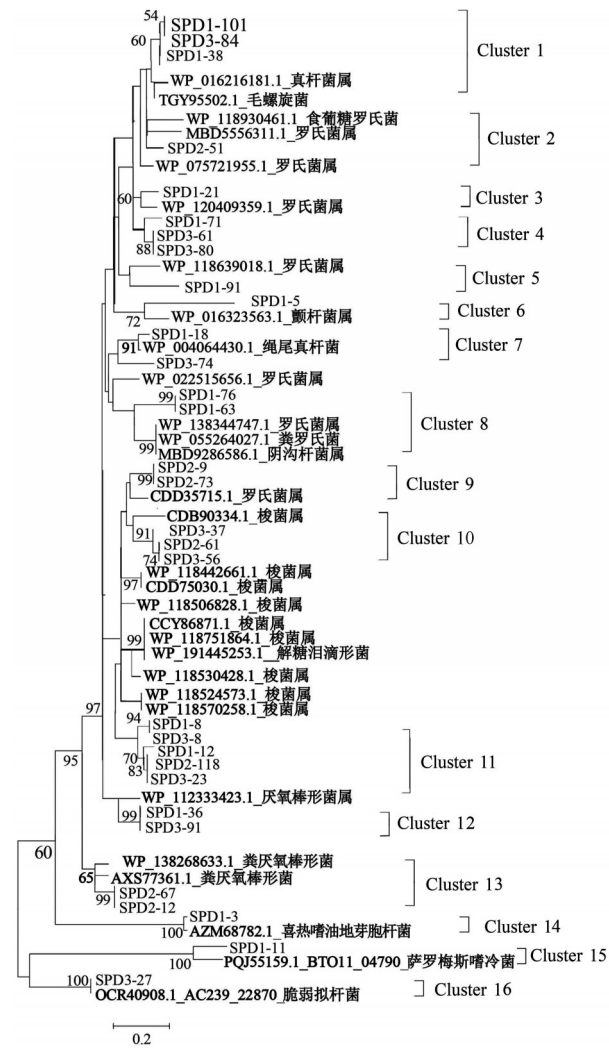
**3.5.1 参苓白术散汤剂治疗AAD大鼠肠道产丁酸菌菌群系统发育树构建结果** 经参苓白术散治疗的AAD大鼠,在属水平的产丁酸菌多样性有明显改变,不仅增加属种类,属的结构有差异。如SPS1以 *Roseburia* 数量最多,共8个属种类,SPS2以 *Clostridium* 数量最多,属种类降到3种,SPS3以 *Eubacterium* 数量最多,属种类数量增加到6种。

根据拓扑结构将菌群划分为簇,从系统发育树

见图3可看出,所有样本序列可归属于16个Cluster。Cluster 1包含5条SPS1的序列,2条SPS3的序列,且具有较强独立性,最近的同源关系属于真杆菌属(*Eubacterium* sp.);Cluster 2包含3条SPS2的序列,与罗斯氏菌属(*Roseburia* sp.)同源关系较高;Cluster 3包含1条SPS1的序列,与 *Roseburia* sp. 同源性较高;Cluster 4包含1条SPS1的序列,5条SPS3的序列,具有独立性;Cluster 5包含2条SPS2的序列,与 *Roseburia* sp. 同源性较高;Cluster 6包含1条SPS1序列,与 *Oscillibacter* 相似性高;Cluster 7包含1条SPS1的序列,1条SPS3的序列,与 *Eubacterium* sp. 相似性高;Cluster 8包含3条SPS1的序列,3条序列属同一个分支,与 *Roseburia* sp. 相似性高;Cluster 9包含3条SPS2的序列,3条序列属同一个分支,与 *Roseburia* sp. 相似性高;Cluster 10包含1条SPS1的序列,2条SPS2的序列,与 *Clostridium* sp. 相似性高;Cluster 11包含1条SPS1序列,10条SPS2序列,7条SPS3序列,具有高度独立性;Cluster 12包含2条SPS1的序列,2条SPS3的序列,具有高度独立性;Cluster 13包含3条SPS2的序列,与 *Anaerofustis stercorihominis* 同源性相近;Cluster 14包含1条SPS1的序列,与 *Geobacillus thermoleovorans* 同源性很高;Cluster 15包含1条SPS1的序列,与变形菌门(Proteobacteria)中的 *Psychrosphaera saromensis* 同源性最近;Cluster 16包含1条SPS3的序列,与拟杆菌门(Bacteroidetes)的脆弱 *Bacteroides fragilis* 同源性最近。结果显示,只有Cluster 11是3个阶段共有的簇,Cluster 3,4,5,7,9,11,12,13,14均只有1个阶段的序列存在。结果显示,只有Cluster 11包含3个阶段的产丁酸菌,其中Cluster 1,4,9,11,12具有独立性,提示可能是肠道中未被发现的产丁酸菌种群。进化树图还显示,肠道产丁酸菌具有一定的聚集性,如Cluster 2,4,8,9,10。

**3.5.2 理中汤汤剂治疗AAD大鼠肠道产丁酸菌菌群系统发育树构建结果** 理中汤治疗的AAD大鼠,产丁酸菌菌群属的种类增加,结构改变。LPT1以 *Clostridium* 属数量最多,共5个属种类,LPT2只有 *Roseburia* 属,LPT3仍以 *Roseburia* 属数量最多,共4种属种类。

将菌群划分为簇,从系统发育树见图4可看出,所有样本序列可归属于9个Cluster。Cluster 1包含1条LPT1的序列,1条LPT2的序列,5条LPT3的序列,具有独立性;Cluster 2中不包含3个阶段的序



图中加粗字体的序列为参考序列,未加粗字体的序列为样本序列(图4同)

图 3 参苓白术散治疗 AAD 大鼠过程肠道产丁酸菌系统发育树  
Fig. 3 Phylogenetic tree of butyric acid producing bacteria in intestinal tract of AAD rats treated with Shenling Baizhusan

列;Cluster 3 包含 4 条 LPT1 的序列,5 条 LPT2 的序列,4 条 LPT3 的序列,没有同源性相近的菌属;Cluster 4 包含 1 条 LPT1 的序列,与 *Lacrimispora* 属同源性高;Cluster 5 包含 1 条 LPT1 的序列,1 条 LPT2 的序列,与 *Eubacterium* sp. 同源性较高;Cluster 6 中不包含 3 个阶段的序列;Cluster 7 包含 1 条 LPT1 的序列,1 条 LPT2 的序列、1 条 LPT3 的序列,没有同源性相近的菌属;Cluster 8 包含 1 条 LPT1 的序列,1 条 LPT2 的序列,与 *Clostridium* sp. 相似性较高;Cluster 9 包含 1 条 LPT1 的序列,1 条 LPT3 的序列,没有同源性相近的菌属;奇异变形菌属 (*Proteus mirabilis*)和 *Bacteroides fragilis* 与 3 个阶段的序列都不具有同源性。

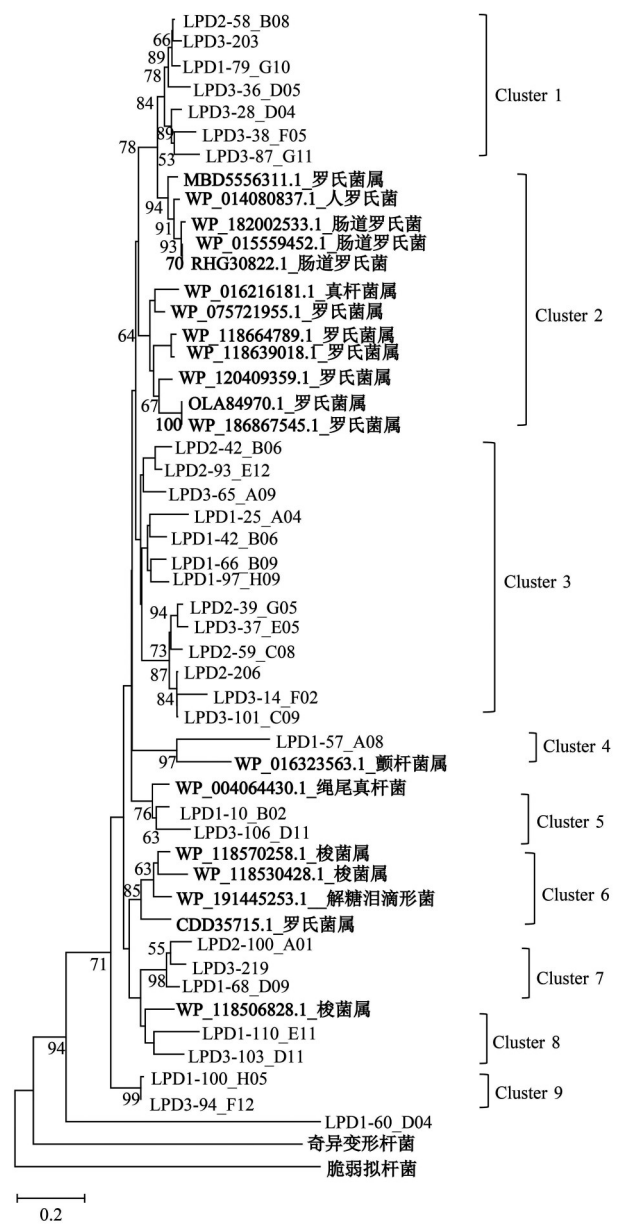


图 4 理中汤治疗 AAD 大鼠过程肠道产丁酸菌系统发育树  
Fig. 4 Phylogenetic tree of butyric acid producing bacteria in intestinal tract of AAD rats treated with Lizhongtang

#### 4 讨论

腹泻是应用抗菌药物最常见的不良反应之一,是由于正常的肠道菌群遭到破坏或药物直接刺激胃肠黏膜,临床上最重要的抗生素相关性腹泻病因是艰难梭菌的过度生长,导致假膜性结肠炎<sup>[23]</sup>。ADD 是重症监护病房(ICU)患者常见并发症之一<sup>[24]</sup>,患者病情危重,自身免疫功能低下,肠道功能受损,肠道内屏障被破坏,菌群失衡,有益菌群生长繁殖受到抑制<sup>[25]</sup>。本研究根据文献采用灌胃抗生素构建肠道菌群紊乱模型,再灌胃艰难梭菌构建 AAD 模型<sup>[26]</sup>。为模拟 AAD 疾病发生过程对肠道产

丁酸菌多样性的影响,本实验选用临床应用广泛的盐酸克林霉素,构建肠道菌群紊乱模型,在灌胃盐酸克林青霉素的过程中,实验大鼠出现精神倦怠、行动迟缓、毛发枯槁、粪便湿润不成型等现象;然后采用艰难梭菌混合菌液进行灌胃,大鼠出现腹泻, AAD大鼠模型建构及模拟干扰过程与设计相符。

产丁酸菌是人类肠道菌群中的一个功能类群<sup>[27]</sup>,能够发酵碳水化合物、主要代谢产物为丁酸<sup>[28]</sup>,广泛分布于革兰氏阳性厌氧菌中<sup>[18]</sup>,是肠道菌群的重要组成部分。产丁酸菌能够影响肠上皮细胞的增殖、分化和凋亡,增强肠黏膜屏障功能,降低肠上皮的通透性,减少炎症因子的产生和减轻炎症带来的损伤<sup>[29]</sup>。丁酸可影响肠上皮细胞的增殖、分化和凋亡,减轻肠黏膜结构损伤,恢复肠道黏膜屏障的完整性<sup>[30]</sup>。参苓白术散能促进肠道菌群-上皮细胞的相互作用,调节肠道菌群紊乱,改善机械屏障<sup>[31]</sup>。理中汤具有明显的缓泻作用,可减低患者血中内毒素水平,调节其肠道菌群,改善肠道微生态平衡<sup>[32]</sup>。参苓白术散、理中汤是临床治疗AAD的常用方,也是治疗AAD的经典复方<sup>[15]</sup>。为研究产丁酸菌群结构的变化,本实验通过丁酰辅酶A-辅酶A转移酶基因引物对AAD大鼠各阶段粪便DNA为模板进行PCR扩增,靶向检测各阶段肠道产丁酸菌群变化,再进行菌群结构的分析。

本实验显示AAD大鼠经参苓白术散和理中汤治疗前后肠道产丁酸菌菌群结构变化显著,参苓白术散和理中汤均能够恢复AAD大鼠肠道产丁酸菌OTU数量和属种类。产丁酸菌菌群变化如下:SPS和LPT造模后,产丁酸菌多样性遭到破坏,分别从正常阶段的8个,6个OTU减少到3个,1个OTU,菌群属种类显著减少;经参苓白术散汤剂治疗后,OTU数量从3个恢复到6个,恢复到正常阶段的75%,主要集中在*Clostridium*丰度显著降低,*Eubacterium*丰度显著升高,且根据系统发育树结果,产丁酸菌菌群的分布由造模后的5个Cluster增加到治疗后的7个Cluster;经理中汤汤剂治疗后OTU数量从2个恢复到4个,恢复到正常阶段的80%,菌种丰度主要集中在*Roseburia*,并且增加了*Eubacterium*,*Lacrimispora*和*Clostridium*的丰度,且产丁酸菌菌群的分布由造模后的3个Cluster增加到治疗后的9个Cluster,产丁酸菌多样性回升,恢复多样性破坏状况。由于组间动物差异,SPS和LPT在正常阶段肠道产丁酸菌菌群属水平结构存在一定差异性,研究表明,目前可检测到的产丁酸菌群

广泛分布于梭状芽孢杆菌中,主要集中在*Eubacterium*和*Roseburia*,*Roseburia*是最丰富的产丁酸菌之一,占微生物总量的0.9%~5.0%,*Eubacterium*属能够在肠道产生以丁酸为主的短链脂肪酸,能提高失调菌群中的丁酸水平,具有免疫维持和抗炎特性,改善肠道上皮屏障功能<sup>[33-34]</sup>,本实验中参苓白术散汤剂和理中汤汤剂在治疗AAD疾病中主要调节的也是这两类菌群的丰度,且增加其他种类的产丁酸菌属种。

综上所述,参苓白术散和理中汤两种传统中药复方在治疗AAD疾病中,能够调节肠道产丁酸菌的结构和丰度,恢复产丁酸菌菌群多样性,改善肠道微生态环境失稳状况。本研究从功能菌群角度研究中药健脾的微生态机制,是中药复方防治AAD疾病药理研究的重要内容,可为类似研究提供参考。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] ITOH K, NARUSHIMA S. Intestinal flora of animal models of human diseases as an environmental factor [J]. *Curr Issues Intest Microbiol*, 2005, 6(1): 9-15.
- [2] MCFARLAND L V. Antibiotic-associated diarrhea: epidemiology, trends and treatment [J]. *Future Microbiol*, 2008, 3(5): 563-578.
- [3] SHAO H Q, ZHANG C Y, XIAO N Q, et al. Gut microbiota characteristics in mice with antibiotic-associated diarrhea [J]. *BMC Microbiol*, 2020, 20(1): 313.
- [4] BARBUT F, MEYNARD J L. Managing antibiotic associated diarrhea [J]. *BMJ*, 2002, 324(7350): 1345-1346.
- [5] MULLISH B H, WILLIAMS H R. Clostridium difficile infection and antibiotic-associated diarrhea [J]. *Clin Med (Lond)*, 2018, 18(3): 237-241.
- [6] MANTEGAZZA C, MOLINARI P, D'AURIA E, et al. Probiotics and antibiotic-associated diarrhea in children: a review and new evidence on *Lactobacillus rhamnosus* GG during and after antibiotic treatment [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 128: 63-72.
- [7] GUO Q, GOLDENBERG J Z, HUMPHREY C, et al. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2019, 4(4): CD004827.
- [8] 曹珍珍,刘增芳,贺兆平,等. 益生菌联合抗生素对抗生素相关性腹泻新生儿肠道菌群的影响 [J]. *中国微生态学杂志*, 2021, 33(7): 806-809.
- [9] POMARES BASCUÑANA R Á, VESES V, SHETH C

- C. Effectiveness of fecal microbiota transplant for the treatment of *Clostridioides difficile* diarrhea: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2021, 73(2): 149-158.
- [10] 任维敏. 苦寒伤胃与肠道菌群失调[J]. *光明中医*, 2011, 26(2): 210-211.
- [11] 桑艳峰, 刘咏梅, 冯会颖, 等. 参苓白术散联合微生态疗法、锌剂对腹泻患者的临床疗效[J]. *中成药*, 2021, 43(4): 922-926.
- [12] 吕沛宛, 李一鹏, 唐祖宣. 唐祖宣应用四君子汤、黄芽汤、理中汤的经验[J]. *光明中医*, 2021, 36(7): 1046-1048.
- [13] 张广玉, 张勤生, 孙晓娜, 等. 参苓白术散加减治疗抗生素相关性腹泻脾胃虚寒证的临床观察[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(19): 74-79.
- [14] 舒青龙, 王萍, 封勇, 等. 理中汤对抗生素相关性腹泻模型构建中肠道菌群变化的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(21): 82-87.
- [15] 沈志华, 王萍, 舒青龙. 中医药治疗抗生素相关性脾虚型腹泻 53 例疗效分析[J]. *江西中医学院学报*, 2013, 25(2): 34-36.
- [16] LOUIS P, FLINT H J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota [J]. *Environ Microbiol*, 2017, 19(1): 29-41.
- [17] YOUNG V B, SCHMIDT T M. Antibiotic-associated diarrhea accompanied by large-scale alterations in the composition of the fecal microbiota [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(3): 1203-1206.
- [18] 林萍, 舒青龙. 基于“产丁酸菌——中药多糖”的中药药理研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(12): 219-226.
- [19] LOUIS P, FLINT H J. Development of a semiquantitative degenerate real-time pcr-based assay for estimation of numbers of butyryl-coenzyme A (CoA) CoA transferase genes in complex bacterial samples [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(6): 2009-2012.
- [20] 李月, 王焕君, 章从恩, 等. 西洋参对抗生素相关性腹泻大鼠肠道菌群的影响研究[J/OL]. *中华中医药学刊*: 1-19 [2021-09-28]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20210813.1624.014.html>.
- [21] 祁玉丽, 李珊珊, 曲迪, 等. 人参中性多糖对小鼠肠道菌群组成及多样性的影响[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(4): 811-818.
- [22] 张丽萍. 基于AAD动物模型的治疗研究中药止泻复方多糖成分调节微生态的机制[D]. 南昌: 江西中医药大学, 2018.
- [23] GIANNELLI F R. Antibiotic-associated diarrhea [J]. *JAAPA*, 2017, 30(10): 46-47.
- [24] 郑彩莲, 张素蕊, 李娟, 等. 四神汤加味对危重患者抗生素相关性腹泻的肠道菌群及免疫功能的影响[J]. *世界中西医结合杂志*, 2021, 16(5): 928-931.
- [25] 何学琴, 黄娟, 罗燕军, 等. 儿童抗生素相关性腹泻危险因素分析[J]. *中国妇幼保健*, 2013, 28(34): 5658-5660.
- [26] 雷会霞, 白明, 苗明三. 基于数据挖掘的中药外治腹泻特点分析[J]. *世界中医药*, 2020, 15(3): 377-380, 384.
- [27] LOUIS P, FLINT H J. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2009, 294(1): 1-8.
- [28] 赵广民, 刘秀婷, 代兵, 等. 金华猪和长白猪肠道产丁酸菌相对丰度与丁酸代谢的相关性分析[J]. *动物营养学报*, 2021, 33(5): 2595-2604.
- [29] 许真源, 李小雅, 许雅青, 等. 产丁酸菌调节肠道微生态及中药的干预作用研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(6): 226-233.
- [30] 张俊杰, 张淑静, 董瑞娟, 等. 高通量测序研究中药经方对正常小鼠肠道菌群的影响[J]. *世界中医药*, 2019, 14(5): 1123-1132, 1138.
- [31] 申中美. 参苓白术散对腹泻型肠易激综合征的临床疗效系统评价及作用机制研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.
- [32] 周晓玲, 余静芳, 刘莹, 等. 从太阴病论治乙型肝炎后肝硬化代偿期患者肠道微生态的临床研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2016, 43(11): 2330-2332.
- [33] TAMANAI-SHACOORI Z, SMIDA I, BOUSARGHIN L, et al. *Roseburia* spp.: a marker of health? [J]. *Future Microbiol*, 2017, 12: 157-170.
- [34] HIIPPALA K, JOUHTEN H, RONKAINEN A, et al. The potential of gut commensals in reinforcing intestinal barrier function and alleviating inflammation [J]. *Nutrients*, 2018, 10(8): 988.

[责任编辑 周冰冰]