

芍药汤对湿热泄泻大鼠的炎性细胞因子与肠道菌群的影响

凌霄*, 李伟霞, 李春晓, 王晓艳, 赵娅, 唐进法, 李学林
(河南中医药大学第一附属医院, 中药临床评价技术河南省工程实验室,
呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 郑州 450001)

[摘要] 目的:明确芍药汤对湿热泄泻大鼠的止泻抗炎作用和肠道菌群调节作用,探讨芍药汤中“通因通用”法的作用机制。方法:采用高温+高湿+高糖高脂饮食+致病因子方式造模,分别设置正常组(不造模)、模型组(给予生理盐水),芍药汤全方组(生药 $5.62\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),芍药汤全方去大黄组(生药 $5.15\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),单味大黄组(生药 $0.01\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),给药5日,每天早晚2次。每天晚上给药3 h后用腹泻指数评估各给药组止泻效果,最后1次给药3 h后用酶联免疫吸附测定法检测大鼠血清中大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α),大鼠白细胞介素-6(IL-6),大鼠白细胞介素-1 β (IL-1 β)和大鼠白细胞介素-2(IL-2)含量,用16sDNA对大鼠粪便中菌群结构进行表征。结果:与模型组比较,芍药汤全方、芍药汤去大黄和单味大黄水煎液均可显著降低大鼠腹泻指数($P<0.01$),其起效速度为芍药汤全方>芍药汤去大黄>单味大黄。与模型组比较,3种给药方案均可显著降低大鼠体内炎症因子水平($P<0.01$),其中芍药汤全方组效果最佳,而单味大黄组和芍药汤去大黄组次之,二者之间并无显著性差异。与模型组比较,各组给药方案均可以显著减少致病菌和条件致病菌(如*Escherichia-Shigella*, *Prevotella*, *Enterorhabdus*和*Bacteroides*)的丰度,增加益生菌(如*Ruminococcus*, *Turicibacter*和*Lachnospiraceae*)的增殖($P<0.01$)。其中单味大黄组、芍药汤全方组和正常组的肠道菌群结构更加接近,芍药汤去大黄组较正常组和其余两个给药组差异较大($P<0.01$)。结论:芍药汤可通过抗炎和调节肠道菌群紊乱两个环节促进湿热泄泻大鼠的转归,方中大黄对于降低有害菌丰度、促进益生菌增殖方面起到关键作用,是芍药汤促进肠道菌群再平衡的关键,也初步证实了芍药汤方用大黄“通因通用”治疗湿热泄泻的科学性。

[关键词] 芍药汤; 湿热泄泻; 肠道菌群; 16sDNA; 大黄

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)05-0016-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220403 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211210.2238.009.html>

[网络出版日期] 2021-12-13 17:14

Effect of Shaoyaotang on Inflammatory Cytokines and Intestinal Flora in Rats with Dampness-heat Diarrhea

LING Xiao*, LI Wei-xia, LI Chun-xiao, WANG Xiao-yan, ZHAO Ya, TANG Jin-fa, LI Xue-lin
(Henan Province Engineering Laboratory for Clinical Evaluation Technology of Chinese Medicine/
Pharmaceutical Department, The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine,
Collaborative Innovation Center for Prevention and Treatment of Respiratory Diseases,
Zhengzhou 450001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Shaoyaotang on diarrhea, inflammation, and intestinal flora in rats with dampness-heat diarrhea and explore the mechanism of therapeutic principle "treating incontinent syndrome with dredging method" of Shaoyaotang. **Method:** The dampness-heat diarrhea model was induced by high temperature, high humidity, high sugar and fat diet, and pathogenic factors. The rats were divided into normal group, model group (normal saline), Shaoyaotang group ($5.62\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), Rhei Radix et Rhizoma (RRER)-free Shaoyaotang group ($5.15\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and RRER group ($0.01\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). The rats were treated

[收稿日期] 20210923(004)

[基金项目] 河南省自然科学基金项目(202300410250);国家自然科学基金项目(82104726);中国博士后65批面上项目(2019M652549)

[通信作者] *凌霄,博士,主管药师,从事中药化学成分分析和体内过程的研究, Tel:0371-66245274, E-mail: tanglima@126.com

correspondingly for five days, twice a day in the morning and evening. The diarrhea index was used to evaluate the antidiarrheal effect of each group three hours after the administration in the evening. The levels of tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-2, and IL-6 in the serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) three hours after the last administration. The structure of intestinal flora in feces was characterized by 16sDNA. **Result:** Compared with the model group, the Shaoyatong group, the RRER-free Shaoyatong group, and the RRER group showed reduced diarrhea index ($P<0.01$), with the onset rates ranking as the Shaoyatong group>the RRER-free Shaoyatong group>the RRER group. Those three groups with drug intervention all showed decreased levels of inflammatory factors ($P<0.01$), especially the Shaoyatong group, and no significant difference was observed between the RRER group and the RRER-free Shaoyatong group. The abundance of pathogenic bacteria and conditioned pathogens (e.g. *Escherichia-Shigella*, *Prevotella*, *Enterorhabdus*, and *Bacteroides*) was reduced and the proliferation of probiotics (such as *Ruminococcus*, *Turicibacter*, and *Lachnospiraceae*) was increased in the groups with drug intervention ($P<0.01$). For the structure of intestinal flora, the RRER group and the Shaoyatong group were close to the normal group, and the RRER-free Shaoyatong group was different from the other three groups ($P<0.01$). **Conclusion:** Shaoyatong can improve the outcome of rats with dampness-heat diarrhea through anti-inflammation and regulation of intestinal flora disorders. RRER in the prescription plays a key role in reducing the abundance of harmful bacteria and promoting the proliferation of probiotics, which is the key of Shaoyatong in promoting the re-balance of intestinal flora. It also confirms the scientificity of treating dampness-heat diarrhea with RRER following the therapeutic principle "treating incontinent syndrome with dredging method".

[**Keywords**] Shaoyatong; dampness-heat diarrhea; intestinal flora; 16sDNA; Rhei Radix et Rhizoma

芍药汤为“通因通用”法的代表方剂之一,首载于《黄帝内经·素问·病机气宜保命集》,后世医家皆推此方为治疗湿热痢疾之主方,目前临床上仍被广泛应用于湿热下痢腹泻。芍药汤全方由白芍、黄连、当归、木香、槟榔、甘草、大黄、黄芩、肉桂组成^[1],其最大的特点在于使用大黄,取其苦寒沉降之性,合芩连则清热燥湿之功著,合归芍则活血行气之力彰,其泻下通腑作用可通导湿热积滞从大便而去,体现“通因通用”之法^[2]。但关于芍药汤“通因通用”治法的科学内涵目前多从中医基础理论出发进行理论分析^[3-4],尚未见采用实验方法对该治法进行深入研究。“以方见法,方能验法”,方剂是治则、治法的具体表现,以代表方剂为载体,开展中医特色治法研究,可为阐明中医特色治则、治法的科学内涵提供新思路。芍药汤中“通因通用”法之要点在于用以泻下通腑作用,通导湿热积滞从大便而去,芍药汤主证为湿热痢疾,其致病过程与肠道菌群紊乱高度相关^[5-6]。湿热泄泻其病因是外感时邪疫毒、内伤饮食不洁以致湿热结于肠腑,大肠传导失司,发为痢疾,与之对应的现代适应症有细菌性痢疾、阿米巴痢疾、急性肠炎等多种常见感染性腹泻^[7-8]。在感染性腹泻的发病过程中,肠道内大量繁殖致病菌,造成肠道菌群紊乱;同时,这些致病菌会分泌内

毒素和外毒素引起炎症反应和小血管循环障碍,导致肠黏膜炎症、坏死及溃疡,破坏肠道屏障,进一步加剧菌群紊乱,造成恶性循环^[9-10]。因此,在湿热泄泻的治疗中,加速致病物质排泄,调节肠道菌群平衡,促进肠道微生态转归是关键环节,是芍药汤中“通因通用”法的核心。

本文以芍药汤为载体,通过大黄在芍药汤中作用机制的研究,探究“通因通用”法的深刻含义,为中医药的特色治则、治法理论的研究提供思路和参考。本实验采用湿热泄泻大鼠模型,比较芍药汤中有无大黄的拆方前后在整体药效、抑制炎症因子和肠道菌群变化3个层面的差异,探究芍药汤中“通因通用”法的作用机制,为中医特色治法研究提供新的思路。

1 材料

1.1 动物 选取健康无腹泻清洁级雄性SD大鼠,体质量(180±20)g,合格证号SCXK(豫)2017-0001,河南省实验动物中心提供,所有的研究严格按照中国实验动物委员会制定指南进行,整个动物实验方案经过河南中医药大学第一附属医院动物实验伦理委员会批准(编号YFYDW2020010),SD大鼠在河南中医药大学第一附属医院清洁级动物实验室饲养,整个实验取材操作也在该实验室内进行。

1.2 药物与试剂 实验所用药材均购自张仲景大药房,由河南中医药大学第一附属医院药检室施钧瀚副主任药师鉴定分别为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* 的干燥根(海王百草堂药业有限公司,批号20200201),毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* 的干燥根茎(批号200301),伞形科植物当归 *Angelica sinensis* 的干燥根(批号200603),菊科植物木香 *Aucklandia lappa* 的干燥根(批号191201),豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 的干燥根及根茎的蜜炙品(批号200508),上述4种饮片均购自亳州市张仲景中药饮片有限责任公司,棕榈科植物槟榔 *Areca catechu* 的干燥成熟种子(批号190501CP0655)和樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* 的干燥树皮(批号20191211),上述2种饮片购自安国市光明饮片加工厂,蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* 的干燥根和根茎(安徽金芙蓉中药饮片厂,批号02-19120201)和唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* 的干燥根(山西振东道地药材开发有限公司,批号20200203)。大肠埃希菌(*Escherichia coli*,中国兽药监察所,批号CVCC1524);大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α),大鼠白细胞介素-6(IL-6),大鼠白细胞介素- 1β (IL- 1β),大鼠白细胞介素-2(IL-2),大鼠胃动素(MTL),大鼠血管活性肠肽(VIP),大鼠生长抑素(SS)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海茁彩生物科技有限公司,批号分别为ZC-37624,ZC-36404,ZC-M6543,ZC-36393,ZC-37312,ZC-37398,ZC-37193);LB肉汤培养基(北京索莱宝科技有限公司,批号L8291);DNA提取试剂盒(DP712)[天根生化科技(北京)有限公司,批号dp712-02];AxyPrep DNA Gel Extraction Kit(美国Axygen Scientific Inc公司,批号AP-GX-250);NEXTFLEX Rapid DNA-Seq试剂盒(美国Bioo Scientific公司,批号5114-08)。

1.3 仪器 HFsafe-1200型Ⅱ级生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司),SPX-150B-8型生化培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂),HVE-50型高压灭菌锅(苏州国高电子有限公司),TS-200B型恒温摇床(上海天呈实验仪器制造有限公司),Multiskan FC型酶标仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司],MiSeq测序仪(美国Illumina公司),GeneAmp 9700型PCR仪(美国ABI公司)。

2 方法

2.1 大鼠湿热泄泻模型制备 参考文献建立大鼠湿热泄泻模型^[11-12],SD大鼠,高糖高脂饲料(普通鼠

粮中加12%猪油,8%蜂蜜)饲料喂养7d,将大鼠置于高温[(32±2)℃]和高湿环境(85%~90%)的环境中7d,灌服白酒(10 mL·kg⁻¹,1次/d),连续3d后,用大肠埃希菌(1×10⁹ CFU·mL⁻¹,10 mL·kg⁻¹)灌胃2d。

2.2 动物分组和各给药方案 SD大鼠,雄性,随机分为正常组、模型组、芍药汤全方组、芍药汤全方去大黄组、单味大黄组,每组6只,正常组不造模,其余4组按照大鼠湿热泄泻模型制备方法造模。正常组和模型组灌胃给药生理盐水,芍药汤全方组灌胃给药芍药汤全方水煎液(每次折合生药5.62 g·kg⁻¹,相当于临床等效量),芍药汤全方去大黄组灌胃给药芍药汤去大黄水煎液(每次折合生药5.15 g·kg⁻¹,相当于临床等效量),单味大黄组灌胃给药单味大黄水煎液(每次折合生药0.01 g·kg⁻¹,相当于临床等效量),给药5日,每日早晚2次。

2.3 药液制备方法 芍药汤全方水煎液:取白芍30 g,当归、黄连、黄芩各15 g,槟榔、木香、炙甘草各6 g,大黄9 g,肉桂5 g,浸泡30 min后,煎煮2次,每次加6倍水,煎煮40 min,合并2次滤液,冷冻干燥后备用,用时用生理盐水溶解为1 g·mL⁻¹的药液灌胃使用。全方去大黄水煎液:取白芍30 g,当归、黄连、黄芩各15 g,槟榔、木香、炙甘草各6 g,肉桂5 g,煎煮方法同芍药汤全方组,合并滤液后,冷冻干燥后备用,用时用生理盐水溶解为含生药质量浓度为1.0 g·mL⁻¹的药液灌胃使用。单味大黄水煎液:取大黄9 g,浸泡30 min后,煎煮2次,每次加6倍水,煎煮40 min,合并2次滤液,冷冻干燥后备用,用时用生理盐水溶解为生药0.5 g·mL⁻¹的药液灌胃使用。

2.4 大鼠腹泻指数测量 每日最后1次给药3 h后,测量腹泻指数。腹泻指数:在每笼大鼠笼底垫上滤纸,观察统计各组大鼠的稀便数和稀便级,稀便率=稀便数/总便数×100%,腹泻指数=稀便率×稀便级。每次给药后更换滤纸,连续观察每次给药后3 h内的排便情况。稀便级的判断标准如下,1级糊状便,直径<2 cm;2级稀糊状便,2 cm<直径<3 cm;3级水样便,直径>3 cm。干便和稀便的区分以滤纸有无污迹为标准。圆形污迹测直径,椭圆形或不规则形测最长的直径和近似圆的直径,两者取平均数^[13]。

2.5 大鼠血清免疫细胞因子(TNF- α , IL- 1β , IL-2, IL-6)和胃肠激素(MTL, VIP, SS)检测 采用ELISA对大鼠血清中相关细胞因子和胃肠激素进行含量测定。按照试剂盒说明书要求在酶标板中加入标准品与待测样品,各样品均设置三孔,37℃温育

30 min, 洗涤后, 加入生物素标记抗体工作液, 重复温育、洗涤后, 加入显色剂, 37 °C 避光 15 min 后加入终止液。采用酶标仪测定各孔吸光度 A , 以标准品 A 和浓度绘制标准曲线, 进行上述指标的定量测定。

2.6 大鼠粪便 16SDNA 多样性检测 无菌采集管, 收集各组最后一次给药 3 h 后的新鲜粪便, -80 °C 冻存备用。采用适量磷酸盐缓冲液 (PBS) 充分混匀 5~10 min, 3 000 ×g 离心 5 min 取上清液, 上述过程重复 3 次, 收集上清液高速离心 15 000 ×g 离心 5 min 后取沉淀, 沉淀的细菌用 PBS 液洗 4 次, 水洗 1 次, 加入蒸馏水 50 μL 悬浮细菌, 加入 1% TritonX-100 50 μL 破碎菌体, 煮沸 5 min 后立即放入冰水中冷却备用。用 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 引物对 V3-V4 可变区进行 PCR 扩增, 扩增程序为: 95 °C 预变性 3 min, 27 个循环 (95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s), 最后 72 °C 延伸 10 min。扩增体系为 20 μL, FastPfu 缓冲液 4 μL, 2.5 mmol dNTPs 2 μL, 引物 (5 μmol) 0.8 μL, FastPfu 聚合酶 0.4 μL; DNA 模板 10 ng。PCR 产物利用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit 进行纯化, 利用 Miseq PE300 平台进行测序。

2.7 生物学信息分析 原始测序序列使用 Trimmomatic 软件质控, 使用 FLASH 软件进行拼接: 设置 50 bp 的窗口, 如果窗口内的平均质量值 < 20, 从窗口开始截去后端碱基, 去除质控后长度 < 50 bp 的序列; barcode 需精确匹配, 引物允许 2 个碱

基的错配, 去除模糊碱基; 根据重叠碱基 overlap 将两端序列进行拼接, overlap 需 > 10 bp。去除无法拼接的序列。使用 UPARSE 软件, 根据 97% 的相似度对序列进行 OTU 聚类; 使用 UCHIME 软件剔除嵌合体。利用 RDP classifier 对每条序列进行物种分类注释, 比对 Silva 数据库 (SSU123), 找出可信度达 80% 以上的种属信息, 并统计样品的物种群落组成; 使用 LEfSe 软件进行组间差异分析, 找出各组中的重要菌属。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析, 剂量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 分析腹泻指数、免疫因子和胃肠激素的组间差异, $P < 0.05$ 差异有明显统计学意义。

3 结果

3.1 对湿热泄泻大鼠排便的影响 与模型组比较, 芍药汤全方组给药第 1 天后腹泻指数就有显著下降 ($P < 0.01$), 后续给药腹泻指数呈显著持续下降趋势, 芍药汤去大黄组在给药第 2 天后显著下降 ($P < 0.01$), 单味大黄组在给药第 3 天后显著下降 ($P < 0.01$)。与芍药汤全方组比较, 芍药汤去大黄组在给药第 1 天后腹泻指数较全方组高 ($P < 0.01$), 其后几天的腹泻指数两组差异无统计学意义; 单味大黄组和芍药汤去全方组的腹泻指数差异较大, 单味大黄组给药 5 d 内腹泻指数均显著高于芍药汤全方组 ($P < 0.01$), 差异有明显统计学意义。上述结果表明各组对腹泻大鼠均有较好的止泻作用, 其中以全方组效果最佳。见表 1。

表 1 芍药汤对湿热泄泻大鼠排便的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effect of Shaoyao tang on defecation in rats with dampness-heat diarrhea ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	腹泻指数				
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
模型		1.30±0.11	1.16±0.06	1.13±0.10	1.33±0.37	0.88±0.07
芍药汤全方	5.62	0.93±0.24 ¹⁾	0.85±0.33 ¹⁾	0.52±0.23 ¹⁾	0.34±0.08 ¹⁾	0.20±0.05 ¹⁾
芍药汤去大黄	5.15	1.16±0.28 ²⁾	0.84±0.15 ¹⁾	0.56±0.17 ¹⁾	0.48±0.08 ¹⁾	0.28±0.07 ¹⁾
单味大黄	0.01	1.19±0.35 ²⁾	1.07±0.21 ²⁾	0.76±0.17 ^{1,2)}	0.76±0.15 ^{1,2)}	0.33±0.08 ^{1,2)}

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与芍药汤全方组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对湿热泄泻大鼠肠道免疫的影响 与正常组比较, 模型组的血清 TNF- α , IL-1 β , IL-2 和 IL-6 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 芍药汤全方组上述细胞因子水平显著降低 ($P < 0.01$), 芍药汤去大黄组 TNF- α , IL-1 β , IL-2 和 IL-6 均显著下降, 其中 IL-1 β , IL-2 和 IL-6 与芍药汤全方组比较显著升高 ($P < 0.01$), 单味大黄组 TNF- α , IL-1 β , IL-2 和 IL-6

显著下降, 但 IL-1 β , IL-2 和 IL-6 仍显著高于芍药汤全方组 ($P < 0.01$)。见表 2。

3.3 对湿热泄泻大鼠胃肠激素的影响 与正常组比较, 模型组的血清 MTL, VIP 水平显著升高, SS 水平显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 芍药汤全方组、芍药汤去大黄组和单味大黄组显著降低 MTL, VIP 水平, 显著升高 SS 水平 ($P < 0.01$); 与芍药汤全

表2 芍药汤对湿热泄泻大鼠肠道免疫的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF- α	IL-1 β	IL-2	IL-6
正常		37.51±1.42	10.44±0.43	0.40±0.01	25.28±0.28
模型		46.23±0.87 ¹⁾	55.05±1.05 ¹⁾	1.85±0.05 ¹⁾	95.95±0.89 ¹⁾
芍药汤全方	5.62	38.42±1.12 ²⁾	12.48±0.42 ²⁾	0.40±0.02 ²⁾	32.36±0.48 ²⁾
芍药汤去大黄	5.15	40.27±0.59 ²⁾	21.92±0.28 ^{2,3)}	0.52±0.03 ^{2,3)}	46.00±0.76 ^{2,3)}
单味大黄	0.01	39.60±1.25	25.48±1.29 ^{2,3)}	0.63±0.03 ^{2,3)}	55.64±1.22 ^{2,3)}

注:与正常组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.01;与芍药汤全方组比较³⁾P<0.01(表3同)。

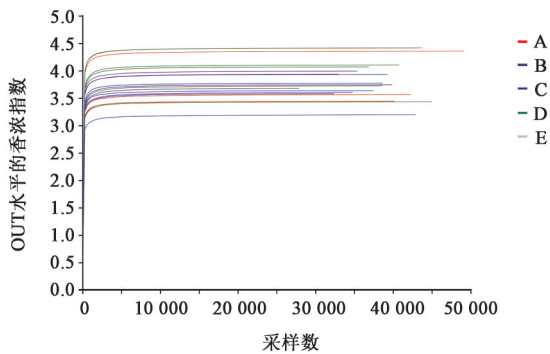
方组比较,芍药汤去大黄组降低MTL, VIP水平更显著(P<0.01)。见表3。

表3 芍药汤对湿热泄泻大鼠胃肠激素的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MTL	VIP	SS
正常		54.18±0.97	28.73±1.10	625.51±6.72
模型		120.82±1.02 ¹⁾	36.46±0.47 ¹⁾	476.71±4.31 ¹⁾
芍药汤全方	5.62	80.35±2.11 ²⁾	32.17±1.40 ²⁾	552.07±2.33 ²⁾
芍药汤去大黄	5.15	65.87±8.90 ^{2,3)}	30.15±0.20 ^{2,3)}	551.64±26.41 ²⁾
单味大黄	0.01	77.93±1.65 ²⁾	31.59±1.53 ²⁾	534.37±11.89 ²⁾

3.4 芍药汤对湿热泄泻大鼠肠道菌群的影响

3.4.1 质控分析 各组的Rank曲线和Shannon曲线平缓集中,表明测序数据足够充分,能够真实反映样品中的大部分微生物信息。见图1,2。



A. 模型组; B. 芍药汤全方组; C. 芍药汤去大黄组; D. 单味大黄组; E. 正常组(图2同)

图1 Shannon稀释曲线

Fig. 1 Shannon dilution curve

3.4.2 Alpha多样性 不同给药组肠道菌群 α 多样性分析结果见表3。由结果可知,模型组的ACE, Chao指数略高于正常组, Shannon指数和Simpson指数无显著差异。生大黄组的ACE指数, Chao指数略低于其他组, 芍药汤全方组和生大黄组的Simpson指数略高于其他组。但总体上,上述各多样性指数在各组间差异无统计学意义。表明在短时间内(1月内)不同状态及不同给药方案对大鼠的

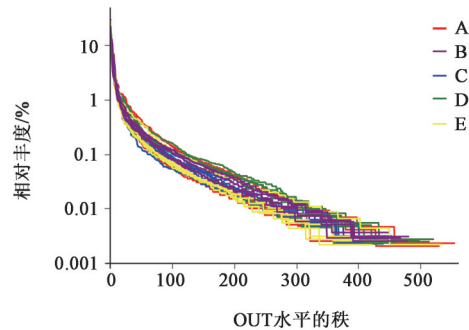


图2 Rank-abundance曲线

Fig. 2 Rank-abundance curve

肠道菌群多样性有较小的影响,但程度有限。

3.4.3 物种组成的分析 在门(phylum)水平上, 5组大鼠菌群种类差异不大,主要由厚壁菌门(Firmicutes), 拟杆菌门(Bacteroidetes), 放线菌门(Actinobacteriota)和变形菌门(Proteobacteria)构成, 相对丰度均>1%,其中Firmicutes和Bacteroidetes丰度共占80%以上。在模型组中,Proteobacteria丰度较高在2.6%以上,而正常组、芍药汤全方、芍药汤去大黄和单味大黄组中丰度较低,均<2%;Firmicutes在模型组中丰度偏低,在70%以下,其次是单味大黄组,丰度为75%左右,在正常组、芍药汤全方组和芍药汤去大黄组中丰度较高,丰度>80%;Actinobacteriota在芍药汤全方组中相对丰度更高(>10%),其次是正常组、芍药汤去大黄组和模型组(相对丰度在7.3%~7.6%),在单味大黄组中相对

表3 各组大鼠粪便样品测序结果及多样性指数

Table 3 Sequencing results and diversity index of fecal samples of rats in each group

样品ID	ACE	Chao	Shannon	Simpson
A-1	544.409 9	540.220 3	3.561 5	0.075 3
A-2	628.399 1	630.327 9	4.413 7	0.030 5
A-3	524.195 3	525.842 1	3.430 4	0.099 0
A-4	496.685 2	530.487 2	3.442 5	0.074 6
A-5	624.143 1	632.020 0	4.355 0	0.034 8
B-1	550.101 6	554.307 7	3.742 9	0.073 9
B-2	520.940 0	523.269 2	3.601 1	0.072 8
B-3	479.528 4	490.538 5	3.507 1	0.068 0
B-4	553.617 2	571.021 3	3.935 7	0.069 0
B-5	521.380 8	531.534 9	3.990 3	0.054 1
C-1	515.814 2	520.125 0	3.677 3	0.064 1
C-2	557.256 7	570.583 3	3.929 7	0.058 7
C-3	535.368 6	550.212 8	3.771 2	0.065 6
C-4	537.529 4	552.062 5	3.633 7	0.080 9
C-5	523.126 8	538.312 5	3.579 4	0.086 8
D-1	499.049 2	493.775 9	3.194 2	0.118 4
D-2	491.633 0	485.840 9	4.412 3	0.032 2
D-3	590.296 6	600.306 1	4.103 3	0.058 5
D-4	597.374 3	596.272 7	3.721 6	0.084 4
D-5	587.505 9	590.888 9	4.068 6	0.056 6
E-1	500.750 4	499.769 2	3.429 6	0.079 7
E-2	494.234 3	492.400 0	3.179 2	0.117 9
E-3	594.930 0	608.375 0	4.201 1	0.041 1
E-4	512.347 6	531.066 7	3.575 5	0.064 9
E-5	499.254 8	509.021 7	3.553 2	0.065 2

注:A.模型组;B.正常组;C.芍药汤全方组;D.芍药汤去大黄组;E.单味大黄组。

丰度偏低(<5%)。见增强出版附件材料。

在属(genus)分类水平上,5组大鼠相对丰度极高(>5%)的菌属种类差异不大,乳酸杆菌属(*Lactobacillus* 菌属),罗姆布茨菌属(*Romboutsia* 菌属),*norank_f_Muribaculaceae* 菌属在每组中均是相对丰度前3位的菌属。但除这3种菌属外其余相对丰度较高(>1%)的菌属在每组间则存在较大差异,整体来看芍药汤全方组、单味大黄组和正常组在菌属构成方面最为接近,其次是芍药汤去大黄组,而模型组和其他四组差异较大。如典型的致病菌大肠杆菌-志贺氏菌属(*Escherichia-Shigella* 菌属)在模型组中相对丰度最高,在其余三组中相对丰度较小(<1%),其中在芍药汤全方组中相对丰度最小,梭菌

属(*Clostridia* 菌属)在模型组和去大黄组中的相对丰度也比正常组、芍药汤全方组和单味大黄组高,但毛螺菌_NK4A136菌属(*Lachnospiraceae_NK4A136* 菌属),*Turibacter* 菌属和葡萄球菌属(*Staphylococcus* 菌属)在模型组中的相对丰度则小于其余4组。此外,*Roseburia* 菌属在芍药汤全方组中相对丰度较高,而在其余3组中相对丰度一般,普雷沃氏菌_NK3B31菌属(*Prevotellaceae_NK3B31* 菌属)在单味大黄组中相对丰度很高(>5%),但在其他组中相对丰度较小。见增强出版附件材料。

3.4.4 差异物种筛选 LEfSE是一种用于发现高纬生物标识和揭示基因组特征的软件,可以检测到与丰度有显著性差异的类群。为了鉴定不同条件下的特定细菌分类群,通过线性判别分析效应大小(LDA)比较来自正常组、模型组、去大黄组、芍药汤全方组、单味大黄组肠道微生物每个物种丰度对差异效果影响的大小。各组大鼠均发现了差异菌属,其中在模型组中发现9个分类群,包括变形菌门(Proteobacteria), γ -变形菌属(*Gammaproteobacteria*),*Escherichia-Shigella*,红螯菌科_UCG_002(*Coriobacteriaceae_UCG_002*),阿托波菌属(*Atopobiaceae*),颤螺菌属(*Oscillospiraceae*),对大肠湿热证有重要作用。弯曲杆菌属(*Campilobacterota*),弯曲杆菌目(*Campylobacterales*),螺杆菌属(*Helicobacter*)和梭菌属(*Clostridia*)等在正常组大鼠中富集;皮杆菌属(*Dermabacteraceae*),微球菌属(*Micrococcaceae*),微杆菌属(*Microbacteriaceae*),短状杆菌属(*Brachybacterium*),毛螺旋菌属(*Lachnospiraceae*)和*Turicibacter*在芍药汤全方组中富集;髌骨细菌门(*Patescibacteria*),*Candidatus_Saccharimonas*和瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)等在芍药汤去大黄组中富集;普雷沃氏菌属(*Prevotella*)单味大黄组中富集。见增强出版附件材料。

进一步统计发现(详见增强出版附件材料),在门分类水平上,与其余4组比较,模型组变形菌门(Proteobacteria)明显增加,厚壁菌门(Firmicutes)明显减少($P<0.05$)。与正常组比较,芍药汤全方组在门分类水平上差异无统计学意义,芍药汤去大黄组中的Patescibacteria明显增加,单味大黄组的拟杆菌门(Bacteroidota)和Proteobacteria明显增加,Firmicutes菌门较正常组明显减少($P<0.05$)。

在属分类水平上,与正常组比较,模型组*Escherichia-Shigella*,拟杆菌属(*Bacteroides*)明显增

加($P<0.05$), *Escherichia-Shigella* 菌属是典型的肠道致病菌, 研究表明 *Escherichia-Shigella* 是感染性腹泻、溃疡性结肠炎等多种肠道疾病的病因之一^[14-15], *Bacteroides* 菌属是临床上最重要的革兰阴性菌, 正常寄居于人和动物的肠道、口腔、上呼吸道和生殖道, 而当机体免疫功能紊乱或菌群失调时, 能导致内源性感染^[16]。

与正常组比较, 芍药汤全方组的 *Escherichia-Shigella*, 大肠埃希菌属 (*Colidextribacter*), 臭气杆菌属 (*Odoribacter*) 和 *Intestinimonas* 明显减少 ($P<0.05$), 肠杆菌属 (*Enterorhabdus*) 和拟杆菌属 (*Bacteroides*) 明显增加 ($P<0.05$)。与模型组比较, 芍药汤全方组 *Escherichia-Shigella* 和 *Prevotella* 明显减少, *Romboutsia*, 棒状杆菌属 (*Corynebacterium*), *Turicibacter* 和 *Lachnospiraceae* 明显增加 ($P<0.05$)。上述菌属涉及一些常见的致病菌/条件致病菌和一些益生菌, 如 *Prevotella* 属常见革兰阴性厌氧杆菌, 主要集聚于正常人体的口腔、女性生殖道等部位, 是临床上较常见的一种条件致病菌, 可引起这些部位的内源性感染^[17]。*Odoribacter*, *Romboutsia*, *Intestinimonas* 和 *Turicibacter* 菌属是人体内潜在益生菌, *Odoribacter* 和 *Romboutsia* 能够产生大量丁酸^[18-19], 有助于减轻炎症反应, 研究表明 1 型糖尿病患儿粪便中 *Intestinimonas* 丰度低于正常组^[20], *Turicibacter* 与增强免疫反应呈正相关^[21]。这些致病菌和益生菌在芍药汤全方组中的变化表明, 与模型组比较, 芍药汤对于肠道菌群紊乱有显著的纠正作用, 可以明显降低致病菌 (如 *Escherichia-Shigella* 和 *Prevotella*), 显著增加潜在益生菌 (*Romboutsia*, *Turicibacter* 和 *Lachnospiraceae*)。但与正常组比较, 芍药汤全方组对部分条件致病菌 (*Enterorhabdus* 和 *Bacteroides*) 的调控作用差异无统计学意义, 对部分益生菌 (*Odoribacter* 和 *Intestinimonas*) 有一定抑制作用。

与正常组比较, 芍药汤去大黄组的 *Clostridium_sensu_stricto_1* 和 *Odoribacter* 明显减少 ($P<0.05$); 与模型组比较, 芍药汤去大黄组 *Escherichia-Shigella* 明显减少, *Ruminococcus*, *Turicibacter* 和 *Lachnospiraceae* 明显增加 ($P<0.05$)。这些结果表明, 芍药汤去大黄组也可以减少致病菌 *Escherichia-Shigella*, 但效果不如芍药汤全方组 (芍药汤全方组的 *Escherichia-Shigella* 显著低于其余 4 组), 可以促进益生菌 *Ruminococcus*, *Turicibacter* 和 *Lachnospiraceae* 的增殖, 但和芍药汤全方组差异无统计学意

义, 与正常组比较, 对部分益生菌 (*Odoribacter* 和 *Intestinimonas*) 有一定抑制作用, 对部分条件致病菌 (*Clostridium_sensu_stricto_1*) 的抑制作用差异无统计学意义。

单味大黄组 *Lachnospiraceae*, *Prevotellaceae* *NK3B31_group* 和 *Prevotella* 较正常组明显增加 ($P<0.05$)。与模型组比较, 单味大黄组 *Ruminococcus* 和 *Lachnospiraceae* 明显增加, *Escherichia-Shigella* 明显减少 ($P<0.05$)。单味大黄组中菌群变化结果表明单味大黄对模型组肠道菌群的调控作用和芍药汤去大黄组及芍药汤全方组类似, 同样表现为一方面减少致病菌 (*Escherichia-Shigella*) 的增殖, 促进益生菌 (*Ruminococcus* 和 *Lachnospiraceae*) 的增殖。在于正常组的菌群差异方面, 单味大黄组和芍药汤全方组类似, 对一些条件致病菌 (*Prevotella*) 抑制作用有限。

4 讨论

本文从整体药效、相关炎症因子及胃肠激素水平和肠道菌群结构 3 个方面分析了芍药汤对大肠湿热证大鼠的作用, 并通过有无大黄的拆方比较, 探究大黄在芍药汤“通因通用”治疗湿热泄泻中的潜在机制。根据各组大鼠腹泻指数的结果, 芍药汤全方组、芍药汤去大黄组和单味大黄组均表现出不同程度的止泻作用, 其中芍药汤全方组和芍药汤去大黄组的止泻效果明显优于单味大黄组。进一步分析研究结果可以发现, 3 种给药方案均可显著降低湿热泄泻大鼠体内炎症因子水平, 其中芍药汤全方组效果最佳, 而单味大黄组和芍药汤去大黄组次之, 二者之间并无显著性差异。造成单味大黄组在降低腹泻指数方面效果不如其余两种给药方案的原因可能与对胃肠激素水平变化有关, 与模型组相比三种给药方案均显著降低 MTL 和 VIP, 显著增加了 SS 的血清含量, 表明 3 种给药方案均可降低湿热泄泻大鼠胃肠道蠕动, 但其中芍药汤去大黄组在降低胃肠蠕动方面比全方组和单味大黄组作用显著, 该现象可能与大黄本身的药理作用相关。生大黄中的蒽醌类成分已被大量研究报道证实具有显著的致泻作用, 可以显著提升 MTL 和 VIP 水平^[22]。因此, 可能是生大黄的使用造成芍药汤全方组在减少胃肠激素水平方面不如芍药汤去大黄组。值得注意的是, 芍药汤全方在改善湿热泄泻大鼠腹泻、减少炎症因子释放方面仍优于去大黄组, 说明芍药汤中配伍大黄有利于湿热泄泻的转归, 通过分析芍药汤的组方原理, 该现象的原因可能与芍药汤的“通

因通用”配伍特色有关。芍药汤的一大配伍特色是方用大黄,通因通用治疗腹泻,因此推测芍药汤中取大黄通利之功,导湿热积滞从大便而去,加速肠道致病菌及有害代谢产物的排出,促进肠道微生态的恢复,各组大鼠肠道菌群结构结果也支持这一推测。

本文中采用16sDNA技术对不同组大鼠粪便中菌群多样性进行了检测,从各组大鼠粪便物种组成和差异物种筛选结果分析,各组给药方案均可以显著改善大肠湿热证大鼠的肠道菌群,主要表现为减少致病菌和条件致病菌(如 *Escherichia-Shigella*, *Prevotella*, *Enterorhabdus* 和 *Bacteroides*)的丰度,增加益生菌(如 *Ruminococcus*, *Turicibacter* 和 *Lachnospiraceae*)的增殖。进一步分析三种给药方案的差异可以发现整体上比较,单味大黄组和芍药汤全方组的肠道菌群结构更加接近,这两组也与正常组菌群结构更相似,而芍药汤去大黄组较正常组和其余两个给药组差异较大。一方面,芍药汤去大黄组的 *Clostridia* 菌属和 *norank_f_Muribaculaceae* 菌属丰度显著高于芍药汤全方组、单味大黄组和正常组, *Escherichia-Shigella* 菌属也略高于正常组和其余两个给药组,其中 *Clostridia* 菌属是一群革兰阳性菌,多数为非致病菌,但也有相当一部分为致病菌^[23], *Escherichia-Shigella* 菌属则是典型的肠道致病菌,芍药汤去大黄组在这些致病菌的抑制方面效果不及全方组和单味大黄组。另一方面 *Lactobacillus* 菌属, *Bifidobacterium* 菌属在芍药汤去大黄组中则低于正常组和其余2个给药组, *Lactobacillus* 菌属是目前已报道的几乎天然存在于所有脊椎动物和哺乳动物肠道内的乳酸菌,对肠黏膜具有很强的黏附能力,可改善肠道菌群分布,拮抗有害菌定植,避免罹患肠道疾病^[24], *Bifidobacterium* 菌属就是人们熟知的双歧杆菌,常作为益生菌而用在食品、医药中广泛使用^[25],芍药汤去大黄组在提高这些益生菌丰度方面作用不及其他两个给药组。这些肠道菌群结果充分表明,芍药汤中有无大黄可以直接影响其对于肠道菌群的调节作用,方中的大黄充分发挥了加速致病菌排除,促进肠道菌群再平衡的作用。

本实验采用高温+高湿+高糖高脂饮食+致病因子方式造模,接近中医证型里的“大肠湿热证”,从实验结果分析,芍药汤在改善肠道菌群稳态方面作用最为显著,此过程中大黄发挥了不可替代的作用,也证明了“通因通用”理论的科学性。但本研究

中仅采用了16sDNA方法对菌群的结构进行了表征,未能进一步进行宏基因组测序,未能更全、精确和深入地分析粪便样本中的各菌群及其基因功能;此外本研究的数据量仍然偏少,且动物实验和临床研究仍有不小区别,因此后期希望能结合临床研究和宏基因组测序技术,更加深入阐明芍药汤作用机制。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 邓中甲.《方剂学》[M].北京:中国中医药出版社,2005:96.
- [2] 俞宜年,林慧光.对通因通用法的认识[J].中华中医药杂志,2009,24(4):482-484.
- [3] 董洪飞.通因通用法探寻及代表方芍药汤配伍特点分析[J].中医研究,2016,29(5):51-53.
- [4] 刘媛,司亚玲,铁生花,等.从广义的“通因通用”角度探讨久泻[J].环球中医药,2021,14(8):1424-1426.
- [5] 常炳龙.大肠湿热证与脾肾阳虚证溃疡性结肠炎患者肠道菌群的差异性研究[D].北京:北京中医药大学,2020:16.
- [6] 付肖岩,劳绍贤,黄志新,等.慢性腹泻脾胃湿热证与肠道菌群的关系[J].中国中西医结合消化杂志,2005,13(4):223-225.
- [7] 张国欣.细菌性痢疾的中医辨治[J].中国医药导报,2008(27):67-68.
- [8] 冯汉财.痢疾的中医古籍整理及临床诊疗方案的梳理[D].广州:广州中医药大学,2011.
- [9] KOPIC S, GEIBEL J P. Toxin mediated diarrhea in the 21 century: the pathophysiology of intestinal ion transport in the course of ETEC, V. cholera and rotavirus infection[J]. Toxins (Basel), 2010, 2(8): 2132-2157.
- [10] ZHANG M, SUN K, WU Y, et al. Interactions between intestinal microbiota and host immune response in inflammatory bowel disease[J]. Front Immunol, 2017, 8:942.
- [11] 王涛.两种不同方法建立大鼠湿热泄泻模型的研究[D].兰州:甘肃农业大学,2016.
- [12] 马琪.基于代谢组学和网络药理学的白头翁汤治疗湿热泄泻的作用机制研究[D].兰州:甘肃农业大学,2018.
- [13] 张薇,葛文静,王慧森,等.痛泻要方加减引经药防风对肠易激综合征大鼠水液代谢和5-HT系统的调控作用[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(11):56-62.
- [14] 师润,陈陆,王川庆.志贺菌致病的分子机制[J].中国人兽共患病学报,2012,28(10):1044-1047,1054.

- [15] KONINCKX P R, USSIA A, TAHLAK M, et al. Infection as a potential cofactor in the genetic-epigenetic pathophysiology of endometriosis: a systematic review[J]. *Facts Views Vis Obgyn*, 2019, 11(3):209-216.
- [16] WEXLER H M. Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20(4): 593-621.
- [17] LARSEN J M. The immune response to Prevotella bacteria in chronic inflammatory disease [J]. *Immunology*, 2017, 151(4):363-374.
- [18] HIIPPALA K, BARRETO G, BURRELLO C, et al. Novel odoribacter splanchnicus strain and its outer membrane vesicles exert immunoregulatory effects *in vitro*[J]. *Front Microbiol*, 2020, 11:575455.
- [19] QIN R, WANG J, CHAO C, et al. RS5 produced more butyric acid through regulating the microbial community of human gut microbiota[J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(10):3209-3218.
- [20] 齐翠娟. 肠道菌群在1型糖尿病患者的结构特征及潜在致病机制研究[D]. 北京:北京协和医学院, 2016:18-24.
- [21] TORAL M, ROBLES-VERA I, DE LA VISITACIÓN N, et al. Role of the immune system in vascular function and blood pressure control induced by faecal microbiota transplantation in rats [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2019, 227(1):e13285.
- [22] 扶垵东,张晶,刘颖,等. 生、熟大黄饮片及其活性组分的泻涩双向调节作用分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(11):127-132.
- [23] MOORE R J, LACEY J A. Genomics of the pathogenic clostridia[J]. *Microbiol Spectr*, 2019, doi: 10.1128/9781683670131.ch58.
- [24] O'CALLAGHAN J, O'TOOLE P W. Lactobacillus: host-microbe relationships [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2013, 358:119-154.
- [25] CUKROWSKA B, BIERA J B, ZAKRZEWSKA M, et al. The relationship between the infant gut microbiota and allergy. the role of bifidobacterium breve and prebiotic oligosaccharides in the activation of anti-allergic mechanisms in early life [J]. *Nutrients*, 2020, 12(4):946.

[责任编辑 周冰冰]