

参苓白术散对抗生素引起肠道菌群失调小鼠的影响

董开忠^{1*}, 高永盛², 秦宁恩加², 苏露¹

(1. 西北民族大学医学院医学中心室, 兰州 730030; 2. 天祝藏族自治县人民医院, 甘肃 天祝 733200)

[摘要] 目的:观察参苓白术散对抗生素诱导的肠道菌群失调小鼠的影响。方法:SPF级BALB/c小鼠72只,自由饮用抗生素头孢曲松钠水溶液5d,制备肠道菌群失调模型,将小鼠分为模型组、培菲康组(0.1 g·kg⁻¹)和参苓白术散低、中、高剂量(0.1, 0.2, 0.4 g·kg⁻¹)组,另设正常组,每组12只。连续给药7d,无菌取粪便,应用平板稀释法培养各组肠道总厌氧菌、嗜酸乳杆菌、双歧杆菌、肠球菌和肠杆菌的变化,ELISA法检测血清IgG、内毒素、血管活性肠肽(VIP)和P物质(SP)的含量。结果:与正常组比较,模型组益生菌(双歧杆菌、乳酸杆菌)显著减少($P < 0.01$),内毒素和SP均明显升高($P < 0.01$),血清IgG及VIP明显降低($P < 0.01$);与模型组比较,参苓白术散低、中、高剂量组内毒素和SP较模型组降低($P < 0.05$),中、高剂量组益生菌、IgG和VIP较模型组升高($P < 0.05$)。结论:参苓白术散能够有效调节抗生素引起的肠道菌群失调,对菌群失调小鼠具有较好的调节作用。

[关键词] 菌群失调; 抗生素; 参苓白术散

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)01-0154-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015010154

Effects of Shenlin Baishu San on the Dysbacteriosis Induced by Antibiotics in Mice DONG Kai-zhong^{1*}, GAO Yong-sheng², QIN Ning-en-jia², SU Lu¹ (1. Medical College, Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730030, China; 2. Tianzhu Tibetan Autonomous County People's Hospital, Tianzhu 733200, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Shenlin Baishu San on the dysbacteriosis induced by antibiotics in mice. **Method:** The healthy SPF BALB/c mice were divided into the normal group, the model control group, the Peifeikang group (0.1 g·kg⁻¹) and the low-, medium-, high-dose Shenlin Baishu San groups (0.1, 0.2, 0.4 g·kg⁻¹). Dysbacteriosis models were induced by antibiotics ceftriaxone sodium solution for 5 days. After 7-day treatment, changes of intestinal flora with sterile take feces were observed using plate dilution method (each intestinal bacteria number was trained). Serum immunoglobulin G (IgG), endotoxin, vasoactive intestinal peptide (VIP) and substance P (SP) content were measured using enzyme linked immunosorbent assay. **Result:** The number of probiotics in the model group was significantly decreased as compared with that in the normal group ($P < 0.01$). Serum levels of endotoxin and SP were significantly higher. serum IgG and VIP were significantly lower in model group than those in control group ($P < 0.01$). The bacteria number, endotoxin, VIP and SP were decreased, serum IgG was increased in all dosages of Shenlin Baishu San groups, there was statistically significant difference as compared with model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Shenlin Baishu San could regulate the balance of intestinal flora effectively.

[Key words] dysbacteriosis; antibiotics; Shenlin Baishu San

稳定和平衡的胃肠道内的微生态区系具有:拮抗病原菌、维护肠黏膜屏障的完整性^[1]、调节免疫^[2]和合成营养成分等^[3]作用,是机体免疫系统不可缺少的重要组成部分。半个多世纪以来抗生素为

人类抗感染治疗做出了巨大的贡献,延长了人类的寿命,然而,近年来不规范使用抗生素已成为临床普遍现象,长期大剂量使用广谱抗生素不仅杀灭了敏感病原菌,而且破坏了机体生理性微生态环境,使得

[收稿日期] 20140728(018)

[基金项目] 中央高校基本科研业务费专项资金项目(ZYZ2012092)

[通讯作者] *董开忠,博士,副教授,从事肠道微生态的研究, Tel:0931-2938150, E-mail:dkz@xbmu.edu.cn

肠道微生态区系失衡即发生菌群失调,进一步发展会出现细菌过生长综合征^[4],内毒素血症^[5],手术患者发生细菌移位、内源性感染等症状^[6]。筛选调整菌群失调快速恢复至正常菌群的微生态环境的药物,具有重要的临床意义。参苓白术散主要有莲子肉、薏苡仁、砂仁、桔梗、白扁豆、白茯苓、人参、炙甘草、白术和山药组成。动物实验证实具有调节胃肠运动和吸收的作用,改善代谢和提高免疫等作用^[7]。有关参苓白术散对肠道菌群失调调整治疗目前尚未见文献报道,本文旨在通过建立抗生素诱导的肠道菌群失调动物模型,探讨参苓白术散对小鼠肠道菌群的影响。

1 材料

1.1 动物 SPF级BALB/c小鼠72只,体重(20±2)g,雌雄各半,由兰州大学医学动物实验中心提供,动物合格证号SCXK(甘)2011-0001。

1.2 药物及试剂 头孢曲松钠 Ceftriaxone Sodium(齐鲁制药有限公司,批号6110078AM),参苓白术散(甘南藏药制药有限公司,批号Z62020111),培菲康(上海信谊药厂有限公司,批号812002466)。IgG,P物质(SP),血管活性肠肽(VIP)及内毒素酶联免疫试剂盒(美国R&D公司进口分装,批号分别为E30442,E40323,E40468和E20316),BHI培养基(厌氧总菌),BSM培养基(歧杆菌),MRS培养基(乳酸杆菌),ESM培养基(肠球菌),SCE培养基(肠杆菌)均购自北京陆桥技术有限责任公司。

1.3 仪器 DRK659厌氧培养箱(德瑞克仪器有限公司),Imark酶标仪(美国Bio-Rad公司),YX-LS-100S2立式高压蒸气灭菌器(上海博讯实业有限公司医疗设备厂),ZHWHY200B摇床(上海智城分析仪器制造有限公司),HPX-9272MBE数显恒温培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂),DL-4000B冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂),CP124S电子天平(德国赛多利斯生物技术有限公司),HFsafe-1200生物安全柜(香港力康生物科技控股集团)。

2 方法

2.1 动物的分组和处理 选用72只小鼠随机分成6组,每组12只(雌雄各半),适应喂养3d后根据试验设计分组:正常组、模型组、培菲康组、参苓白术散低、中、高剂量组。正常组小鼠饮用无菌水,于第5天眼眶采血并脱颈处死,无菌取其盲肠内容物。模型组^[8-9]小鼠用无菌水稀释头孢曲松钠至0.5g·L⁻¹,断水自由饮用(根据每天统计的饮水量为6~7

mL计算,与成人的正常剂量相当)抗生素溶液5d,观察其行为并镜检粪便,建模成功后随机选取12只眼眶采血、无菌取其盲肠内容物作菌群培养分析和检测。随机取12只模型小鼠作为培菲康组,将抗生素溶液换为无菌水1d后,用培菲康(0.1g·kg⁻¹)ig,0.2mL/次,2次/d,1周后采集相关标本作检测。随机取36只模型小鼠作为参苓白术散组,将抗生素溶液换为无菌水1d后,分别给予低、中、高剂量(0.1,0.2,0.4g·kg⁻¹)参苓白术散ig,2次/d,0.2mL/次,1周后采集相关标本作检测。

2.2 盲肠内容物活菌计数 无菌取小鼠盲肠内容物0.1g加入0.9mL稀释液,振荡使之均匀,采用选择性培养进行平板计数。总厌氧菌用BHI培养基,嗜酸乳杆菌用MRS培养基,双歧杆菌用BSM培养基,肠球菌用ESM培养基,肠杆菌用SCE培养基。MRS,BHI和BSM平板置于37℃厌氧条件下培养24~72h后计数;ESM,SCE平板置于37℃有氧条件下培养24h后计数。活菌计数每克粪便中菌的对数值表示。

2.3 血清内毒素及IgG检测 无菌眼眶采血,置4℃冰箱自然沉降3h,3000r·min⁻¹离心15min取其上清,-20℃储存备用。按照ELISA试剂盒说明检测血清IgG和内毒素。

2.4 胃肠道激素检测 血清采取同2.3,按照ELISA试剂盒说明测定VIP和SP。

2.5 统计学方法 采用SPSS 13.0软件进行统计分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同实验组之间的差异分析采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对肠内菌群的影响 自由饮用抗生素第5天后,大部分小鼠出现腹泻、毛色黯淡、灵活性下降,取新鲜粪便培养观察,乳杆菌、肠球菌和双歧杆菌明显减少,表明建模成功。模型组较正常组总厌氧菌、双歧杆菌、肠杆菌、乳酸杆菌和肠球菌明显减少($P < 0.01$);参苓白术散低、中、高剂量组有益菌双歧杆菌、乳酸杆菌与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

3.2 对血清内毒素及IgG含量的影响 模型组内毒素和IgG含量与正常组比较差异有显著统计学意义($P < 0.01$);经参苓白术散低、中、高剂量治疗后,中、高剂量组小鼠内毒素含量较模型组降低($P < 0.05$),低剂量组则无统计学意义。3个剂量治疗组小鼠血清IgG含量较模型组升高($P < 0.05$),而培菲康组与模型组比较差异无统计学意义。见表2。

表 1 参苓白术散对盲肠内容物活菌计数肠内菌群的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 1 Effect of Shenlin Baishu San on intestinal flora in the count of bacteria in cecal contents ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	肠内菌群/logCFU·g ⁻¹				
		总厌氧	双歧杆菌	肠杆菌	乳酸杆菌	肠球菌
正常	-	9.78 ± 0.13	0.21 ± 0.17	9.82 ± 0.13	5.62 ± 0.31	9.26 ± 0.19
模型	-	5.36 ± 0.26 ²⁾	3.49 ± 0.18 ²⁾	3.19 ± 0.37 ²⁾	3.56 ± 0.21 ²⁾	4.78 ± 0.23 ²⁾
培菲康	0.1	9.58 ± 0.23 ³⁾	9.82 ± 0.23 ³⁾	9.57 ± 0.21 ³⁾	5.36 ± 0.28 ³⁾	9.12 ± 0.18 ³⁾
参苓白术散	0.1	8.41 ± 0.25 ³⁾	7.23 ± 0.23 ³⁾	8.53 ± 0.19 ³⁾	5.43 ± 0.14 ³⁾	7.67 ± 0.21 ³⁾
	0.2	9.61 ± 0.28 ³⁾	8.23 ± 0.21 ³⁾	9.53 ± 0.18 ³⁾	5.23 ± 0.13	8.78 ± 0.23 ³⁾
	0.4	8.63 ± 0.28 ³⁾	8.14 ± 0.22 ³⁾	8.78 ± 0.21 ³⁾	5.31 ± 0.13 ³⁾	8.53 ± 0.23 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 2~3 同)。

表 2 参苓白术散对血清内毒素及 IgG 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 2 Effect of Shenlin Baishu San on serum endotoxin and IgG content ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	内毒素/EU·L ⁻¹	IgG/mg·L ⁻¹
正常	-	38.20 ± 3.12	4.36 ± 0.28
模型	-	87.34 ± 6.22 ²⁾	2.41 ± 0.22 ²⁾
培菲康	0.1	58.24 ± 5.27 ³⁾	2.86 ± 0.25
参苓白术散	0.1	79.78 ± 8.25	3.24 ± 0.31 ³⁾
	0.2	58.67 ± 6.25 ³⁾	3.58 ± 0.31 ³⁾
	0.4	60.48 ± 5.36 ³⁾	3.24 ± 0.28 ³⁾

3.3 对血清 SP, VIP 含量的影响 与正常组比较, 模型组 SP 含量明显升高 ($P < 0.01$), VIP 含量明显降低 ($P < 0.01$); 经参苓白术散低、中、高剂量治疗后, 各剂量组小鼠 SP 含量较模型组降低 ($P < 0.05$), 3 个剂量组间 SP 含量无明显差异, 中、高剂量治疗组 VIP 含量较模型组升高 ($P < 0.05$)。结果见表 3。

表 3 参苓白术散对血清 SP, VIP 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Shenlin Baishu San on serum SP, VIP content ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SP/ng·L ⁻¹	VIP/ng·L ⁻¹
正常	-	64.20 ± 14.28	120.15 ± 18.28
模型	-	120.34 ± 14.22 ²⁾	63.28 ± 10.25 ²⁾
培菲康	0.1	85.28 ± 3.25 ³⁾	82.28 ± 9.23 ³⁾
参苓白术散	0.1	86.78 ± 9.25 ³⁾	70.26 ± 10.43
	0.2	85.48 ± 8.35 ³⁾	90.28 ± 11.36 ³⁾
	0.4	87.57 ± 9.13 ³⁾	91.17 ± 11.23 ³⁾

4 讨论

近年来, 由于临床抗感染中抗生素的广泛应用, 导致机体肠道菌群失调较常见, 尤其婴幼儿和部分慢性消耗性患者的抗生素相关性腹泻的治疗比较棘

手, 因此探寻较理想的治疗抗生素相关性菌群失调的方法国内外日益受到关注。目前, 国内外多采用微生态制剂来调整或干预, 我国中医药在腹泻方面的治疗有着悠久的历史并积累了丰富的经验, 传统中医药将其归属“泄泻”范畴。如余志坚等^[10]、林群莲等^[11]和郭智涛等^[12]均认为: 伪膜性肠炎是长期或大量应用抗生素后所致的肠道菌群失调症, 属中医“泄泻”范畴。中医认为: “泄泻之本, 无不由于脾胃”, 急性泄泻病多偏实, 责在脾胃; 慢性泄泻病多为虚, 每及脾肾。前者当清热化湿, 后者应补脾益肾, 治则益气健脾。参苓白术散主治脾气虚弱, 湿邪内生, 其中人参、白术、茯苓益气健脾渗湿为君, 配伍山药、莲子肉助君药以健脾益气, 兼能止泻。

本文应用抗生素头孢曲松钠自由饮用成功制备菌群失调动物模型, 观察参苓白术散对菌群失调小鼠模型肠道菌群数量、血清 IgG、内毒素、VIP 和 SP 的影响。结果表明, 模型组小鼠肠道益生菌双歧杆菌、乳酸杆菌和肠球菌数量较正常组明显减少, 治疗组益生菌数量增加较模型组快。说明参苓白术散不仅抑制了致病菌或条件致病菌的过度增殖, 明显促进肠道益生菌乳酸杆菌、双歧杆菌等生理性细菌的增殖。

模型组小鼠血清 IgG 及 VIP 较正常组显著降低, 且内毒素及 SP 较对照组显著升高, 经治疗后测试血清 IgG 及 VIP 较模型组显著升高, 内毒素及 SP 较模型组显著降低, 表明菌群失调存在血清 SP 与 VIP 的变化。菌群失调小鼠由于肠道有益菌群数量减少, 条件致病菌及革兰阴性菌大量繁殖产生大量内毒素致肠黏膜局部损伤, 使得机体 VIP 发挥抗感染效应, 过度消耗 VIP 使其水平低于正常组, 治疗后 VIP 增加, 一方面通过抑制致炎因子 IL-1, IL-5, IL-8, IL-6, IL-12, TNF- α 和趋化因子的产生, 减轻对肠黏

膜局部的损伤作用,同时,促进 IL-4, IL-10, TGF- β 等多种抗炎因子的表达^[13]来调节免疫力,改善肠道内环境与肠黏膜微循环状态,促进有益菌的定植使菌群比例恢复正常,肠功能改善。菌群失调后肠内毒素、炎症介质等有害物质在肠黏膜局部集聚增多,使 SP 神经元释放增加。SP 增加使得迷走神经产生兴奋,致胃肠功能紊乱,治疗后免疫功能提高,免疫致炎因子减少神经元释放 SP 减少,腹胀、腹泻情况自然好转^[14-15]。

本文实验研究结果表明参苓白术散能够促进益生菌的增殖、调整机体的免疫功能、调节肠道运动,为参苓白术散治疗菌群失调提供了实验依据,同时为治疗肠道菌群失调症提供了新思路和方法。但其如何阻断病原菌致病过程和增强对感染的抵抗力的机制尚需从多角度、多层次进行探讨。

[参考文献]

[1] Rakoff Nahoum S, Paglino J, Eslami Varzaneh F, et al. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis[J]. Cell, 2004, 118(2):229-235.

[2] Shuang Zhang, Yun Liu, Shouli Guo, et al. Vasoactive intestinal polypeptide relaxes isolated rat pulmonary artery rings through two distinct mechanisms [J]. J Physiol Sci, 2010, 60(10):389-393.

[3] Anthony M Szema, Sayyed A Hamidi, Marc G Golightly, et al. VIP regulates the development & proliferation of treg *in vivo* in spleen[J]. Allergy Asthma Clin Immunol, 2011, 19 (7):2-7.

[4] Schröder O, Gerhard R, Stein J. Antibiotic associated diarrhea [J]. Z Gastroenterol, 2006, 44 (2): 193-197.

[5] Brandl Katharina, Plitas George, Mihu Coralia N, et al. Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic

induced innate immune deficits [J]. Nature, 2008, 455 (7214):804-809.

[6] Beaugerie L, Petit J C. Microbia-gut interactions in health and disease. Antibiotic-associated diarrhoea [J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2004, 18 (2): 337-342.

[7] 万国靖,张守堂,车丽萍. 参苓白术散对腹泻小鼠胃肠运动功能的影响及机制探讨[J]. 山东医药, 2012, 52(48):48-50.

[8] 王瑞君,黄雪峰,唐欢,等. 抗生素诱导的胃肠道菌群失调动物模型的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(3):145-148.

[9] 谢彩虹,袁静,王瑞君,等. 嗜酸乳杆菌对抗生素诱导小鼠肠道菌群失调的作用[J]. 肠外与肠内营养, 2007, 14(3):132-135.

[10] 余志坚,管华英,魏辉. 中药治愈伪膜性肠炎 1 例 [J]. 第一军医大学分校学报, 2000, 7(1):80-83.

[11] 林群莲,黄发盛. 抗生素相关性肠炎的中医诊治体会 [J]. 光明中医, 2005, 20(3):12-14.

[12] 郭智涛,李建昌. 中西医结合治疗伪膜性肠炎[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2000, 6(1):12-15.

[13] Ling Huang, Yiting Tang, Jiao Qin, et al. Vasoactive intestinal peptide enhances TNF- α induced IL-6 and IL-8 synthesis in human proximal renal tubular epithelial cells by NF- κ B dependent mechanism [J]. Inflammation, 2012, 35(11):1154-1160.

[14] 郝秀春. 双歧杆菌对菌群失调大鼠血清 NO 及 NOS 的影响 [J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23 (2): 101-104.

[15] Neşe Tunçel, Orhan Tansel Korkmaz, Neslihan Tekin, et al. Antioxidant and anti-apoptotic activity of vasoactive intestinal peptide (VIP) against 6-hydroxy dopamine toxicity in the rat corpus striatum [J]. J Mol Neurosci, 2012, 46(11):51-57.

[责任编辑 周冰冰]