

· 药理 ·

# 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

舒青龙\*, 王萍, 封勇, 冯洁  
(江西中医药大学, 南昌 330004)

**[摘要]** **目的:**观察抗生素相关性腹泻(AAD)模型构建过程中肠道菌群结构变化及理中汤对AAD模型肠道菌群结构的影响。**方法:**先选取81只雄性BALB/c小鼠进行预实验,用高、中、低剂量(5, 1, 0.5 g·kg<sup>-1</sup>)氨苄青霉素构建肠道菌群紊乱模型,再灌胃艰难梭菌(1.6×10<sup>8</sup> CFU)构建AAD模型,并用高、中、低剂量(7.5, 5.5, 3.5 g·kg<sup>-1</sup>)理中汤进行治疗。按动物表型变化得出最佳造模及治疗条件,再选取20只雄性BALB/c小鼠,随机分为4组(各组n=5):空白组、肠道菌群紊乱组、AAD组、理中汤治疗组(7.5 g·kg<sup>-1</sup>)按最优化步骤进行造模及治疗,各组粪便混合为样品XL1, XL2, XL3, XL4,应用16S rRNA高通量测序技术研究其菌群变化。**结果:**AAD模型构建的表型变化符合AAD临床表现。XL1~XL4 4组样品菌群基于最小操作分类单元(OTUs)的变化为:860, 282, 385, 394个;基于门水平的丰度变化为:变形菌门(6.94%, 41.77%, 1.99%, 2.89%),厚壁菌门(44.34%, 34.89%, 36.82%, 32.11%),拟杆菌门(46.6%, 22.74%, 60.8%, 64.49%);基于属水平的数量变化为:88, 58, 52, 59个,各组间菌群变化明显,(P<0.05)。**结论:**AAD模型构建过程中肠道菌群结构变化剧烈,多样性及丰度均下降;理中汤能改变AAD模型肠道菌群结构,增加菌群多样性。

**[关键词]** 抗生素相关性腹泻; 理中汤; 肠道菌群; 微生物生态

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)21-0082-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015210082

## Influence of Lizhong Tang Intestinal Flora Changes in Its Treatment to AAD Model

SHU Qing-long\*, WANG Ping, FENG Yong, FENG Jie (Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the intestinal flora changes during the construction of antibiotic associated diarrhea (AAD) model and the effect of Lizhong Tang on intestinal flora changes in AAD model. **Method:** Eighty-one male BALB/c mice were selected for preliminary experiment. High, medium and low dose (5, 1, 0.5 g·kg<sup>-1</sup>) ampicillin was used to construct intestinal flora disorder model, then the mice were fed with *Clostridium difficile* (1.6×10<sup>8</sup> CFU, colony-forming units) to construct the AAD model, and finally were treated with high, medium and low dose (7.5, 5.5, 3.5 g·kg<sup>-1</sup>) Lizhong Tang respectively. According to the animal phenotype and optimum treatment conditions during preliminary experiment, 20 male BALB/c mice were selected and randomly divided into 4 groups (n=5 in each group): blank group, intestinal flora disorder group, AAD group, Lizhong Tang treatment group (7.5 g·kg<sup>-1</sup>). Modeling and treatment were conducted according to optimization steps. Fecal samples in four groups were respectively mixed as XL1, XL2, XL3, XL4, and then were subjected to flora changes analysis using 16 S rRNA high-throughput sequencing technology. **Result:** The phenotypic changes during AAD model building were consistent with clinical AAD symptom. The intestinal flora changes at OTUs level were 860, 282, 385, and 394, respectively; the abundance changes at phylum level were as follows: Proteobacteria (6.94%, 41.77%, 1.99%, 2.89%), Firmicutes (44.34%, 34.89%, 36.82%, 32.11%), Bacteroidetes (46.6%, 22.74%, 60.8%, 64.49%) respectively; the number changes at genus

**[收稿日期]** 20150213(007)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81473455, 31560038);江西省自然科学基金项目(20122BAB205073);江西省教育厅项目(GJJ13598)

**[通讯作者]** \*舒青龙, 博士, 副教授, 从事环境微生物学工作, Tel:0791-87118921, E-mail:shuqinglong@126.com

level were 88, 58, 52, and 59 respectively. There were significant flora changes in all groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The intestinal flora structures were changed drastically with decreased diversity and abundance during the construction of AAD model; Lizhong Tang could change the structure of intestinal flora in AAD model, and increase the diversity of flora.

**[Key words]** antibiotic associated diarrhea; Lizhong Tang; intestinal flora; micro ecology

抗生素相关性腹泻 (antibiotic associated diarrhea, AAD) 为一种严重的药源性腹泻病, 对人们的健康影响严重<sup>[1]</sup>。引起 AAD 的因素有 2 个: 第 1 个为滥用抗生素, 如青霉素类、克林霉素、头孢二代等; 第 2 个因素为致病菌的侵入, 最常见的为产菌素艰难梭菌 (10% ~ 25% 的 AAD 均由艰难梭菌引起), 其在小肠上的定植会进一步恶化肠内菌群微生态系统失衡从而导致该病<sup>[2-3]</sup>。

相比于只针对病原体的治疗, 中药复方具有比西药更合理的理念与疗效。采用健脾益气之法, 再根据兼证之不同以治其标<sup>[8]</sup>。结合中医理论, 中医药对 AAD 的治疗主要是恢复宿主的相互和谐的微生态系统, 即恢复中医的“正气”<sup>[4-5]</sup>。中医药对于 AAD 病具有较好的疗效, 其中临床上应用广泛且具有较好疗效包括理中汤、四君子汤、参苓白术散、四神丸等<sup>[6-8]</sup>。

最近有文献报道, 理中汤对脾阳虚证大鼠及腹泻型肠易激综合征 (irritable bowel syndrome, IBS) 大鼠的药理学研究<sup>[9-10]</sup>, 然而, 理中汤治疗 AAD 病的药理学研究尚无报道<sup>[11]</sup>, 主要原因是: ①尚无 AAD 动物标准模型的构建方法; ②中医药与肠道生态学的交叉研究尚待深入。据此, 本实验的目的为尝试构建 AAD 小鼠动物模型, 并采用 454 焦磷酸测序的技术研究动物模型构建及中药复方理中汤治疗过程中的肠道菌群变化<sup>[12]</sup>, 为 AAD 动物模型构建提供参考, 为理中汤治疗 AAD 病提供微生态学证据。

## 1 材料

**1.1 药物** 理中汤 (人参 15 g, 干姜 15 g, 甘草 15 g, 白术 15 g) 均购自江西中医药大学附属医院。

**1.2 菌株** 艰难梭菌 *Clostridium difficile* 菌株 SH186, SH182, NC-1, NC-2, 均为临床分离株 (2 株为 A<sup>+</sup>B<sup>+</sup>, 2 株为 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup>)<sup>[13]</sup>。

**1.3 试剂** 细菌 DNA 提取试剂盒 [天根生化科技 (北京), 批号 D824A], LA *Taq* DNA 聚合酶 (日本 Takara 公司, 批号 DRR002A); 厌氧菌培养基 BHI (Oxoid 公司, 批号 CM1136, CM1135), 艰难梭菌选择性培养基 (批号 CM0106), 环丝氨酸和头孢西丁 (批号 SR0096), 去纤维蛋白马血 (批号 SR0050), 厌氧产

气袋 (批号 AN0020), 刃天青 (批号 BR0055), 均为 Oxoid 公司。

**1.4 仪器** BIOER Life Express 型 PCR 仪 (中国杭州博日), 752 型紫外分光光度分析仪 (中国上海棱光), SW-CJ-2D 型净化操作台 (中国苏州净化), H-1650-型高速离心机 (中国湖南湘仪), YQX-II 型系列厌氧培养箱 (中国上海新苗医疗器械), SPX-150B-Z 型生化培养箱 (中国上海光都仪器)。

**1.5 动物** BALB/c 小鼠, 体重 20 ~ 25 g, 雄性, 101 只, 清洁级, 购自江西中医药大学动物实验中心, 合格证号 SCXK (赣) 2005-0001。

## 2 方法

**2.1 中药复方煎液** 人参 15 g, 干姜 15 g, 甘草 15 g, 白术 15 g 混合, 文火煎 20 min, 水煎煮 2 次合并滤液, 浓缩成为 400 mL 的理中汤水煎液 (质量浓度 150 g·L<sup>-1</sup>) 备用。

**2.2 艰难梭菌厌氧培养** 所有菌株先活化复壮, 然后接种约 1 × 10<sup>3</sup> 细胞至 BHI 培养基, 37 °C 厌氧培养 12 h 后收集菌液备用<sup>[12]</sup>。

### 2.3 AAD 小鼠模型的构建及中药治疗预实验

**2.3.1 菌群紊乱动物模型构建** BALB/c 小鼠, 体重 20 g 左右, 雄性, 81 只。饲料、水、垫料都经高温灭菌, 动物饲料盒用过氧乙酸浸泡消毒。81 只 BALB/c 小鼠随机分为 4 组: 空白组 ( $n = 18$ , ig 生理盐水), 高、中、低剂量组 ( $n = 21$ , ig 氨苄青霉素 5, 1, 0.5 g·kg<sup>-1</sup>)。氨苄青霉素液每日更换, 每次 ig 0.2 mL, 每天 2 次, 连续 7 d, 同时观察小鼠的行动活跃程度、饮食变化、被毛平整度等, 采取粪便样进行肠杆菌、肠球菌、双歧杆菌、乳酸菌、厌氧总菌的活菌检测, 以确定菌群紊乱模型构建中抗生素的最佳剂量<sup>[14]</sup>。

**2.3.2 AAD 模型的构建** 根据粪便样菌群分析结果, 选取菌群紊乱动物模型构建成功的小鼠, 停止氨苄青霉素的给药, 用艰难梭菌 ig (2 种为 A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> 菌株, 2 种为 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 菌株, BHI 培养 12 h 后混合, 混合菌液密度 8 × 10<sup>7</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>), 每次染菌量为 2 mL (约 1.6 × 10<sup>8</sup> CFU), 每天 2 次, 直至实验动物出现腹泻症状。

**2.3.3 理中汤治疗 AAD 模型动物** AAD模型构建后,停止艰难梭菌的灌胃,并用理中汤高、中、低剂量(7.5,5.5,3.5 g·kg<sup>-1</sup>)进行治疗,每天 ig 2 次,共 7 d。观察 AAD 模型动物治疗结果,并根据活跃程度、饮食变化、被毛平整度、粪便活菌检测。结果确定菌群紊乱动物模型构建中抗生素氨苄青霉素的最佳剂量,确定理中汤治疗 AAD 的最佳剂量。

**2.4 AAD 小鼠模型构建及中药治疗** BALB/c 小鼠,体重 20 g 左右,雄性,20 只。随机分为 4 组(各组 n = 5):空白组,肠道菌群紊乱组,AAD 组,AAD 理中汤治疗组。其中空白组对应于 XL1,正常饮食;肠道菌群紊乱组对应于 XL2,按 2.3.1 进行氨苄青霉素 ig(5 g·kg<sup>-1</sup>);AAD 组对应于 XL3,按 2.3.1 先进行氨苄青霉素 ig(5 g·kg<sup>-1</sup>),再进行混合艰难梭菌 ig(菌液密度为 8 × 10<sup>7</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>);XL4 按 XL3 构建 AAD 模型后,再进行理中汤 ig 治疗(7.5 g·kg<sup>-1</sup>),共 7 d。

### 2.5 高通量测序

**2.5.1 粪便采样** 按 2.3 预实验步骤,采集每组动物的粪便样品,每组的样品(n = 5)混合为一个样品,用于后面的菌群分析。

**2.5.2 粪便细菌 DNA 提取** 用 DNA 提取试剂盒提取小鼠粪便样 XL1, XL2, XL3, XL4 的 DNA。

**2.5.3 16 S rRNA 基因扩增** 用细菌 16 S rRNA 基因引物 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 533R 5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3' 进行 PCR 扩增。

**2.5.4 PCR 扩增结果检测** 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,2 μL 上样检测;凝胶回收试剂盒切胶回收 PCR 产物,Tris-HCl 洗脱。

**2.5.5 菌群 16 S rRNA 高通量测序** 样品送美吉公司进行 16 S rRNA 基因 454 焦磷酸测序;测序结果用 Mothur 软件进行分析<sup>[15]</sup>。

**2.6 菌群结构变化的 P 值分析** 4 个样品基于 16 S rRNA 基因序列的差异用微生态软件 J-LIBSHUFF 进行 P 值分析,P < 0.05 为有统计学意义。

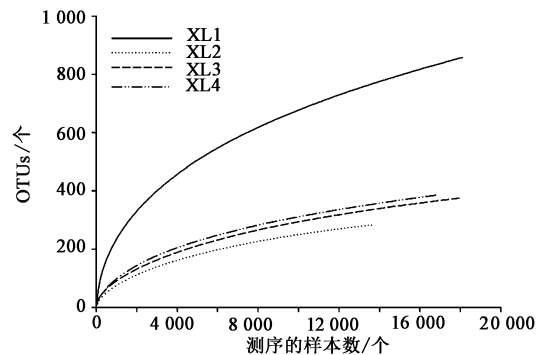
## 3 结果

**3.1 AAD 小鼠模型的构建及中药治疗** AAD 小鼠模型的构建及中药治疗预实验中,构建肠道菌群紊乱模型及理中汤治疗时尝试了高、中、低 3 个剂量的氨苄青霉素及理中汤,经观察小鼠的行动活跃程度、饮食变化、被毛平整度等,及对粪便样肠杆菌、肠球菌、双歧杆菌、乳酸菌、厌氧总菌的活菌检测,高剂量

氨苄青霉素组(5 g·kg<sup>-1</sup>)和高剂量理中汤组(7.5 g·kg<sup>-1</sup>)引起的肠道菌群紊乱模型及治疗效果较为典型,因而确定为用于肠道菌群实验的剂量。

AAD 模型建构过程中,实验小鼠在灌胃抗生素后行动迟缓,出现畏寒挤缩现象,饮食下降,被毛糙乱无光泽,粪便呈黄色、湿润样,7 d 后粪便蓬松;灌胃 4 种艰难梭菌混合菌液 4 d 后,粪便呈稀便样;理中汤(7.5 g·kg<sup>-1</sup>)治疗 7 d 后畏寒、饮食下降等有改善,且稀便样粪便消失。

**3.2 菌群 16 S rRNA 序列稀释曲线(rarefaction curve)及最小操作分类单元(OTUs)分析** 用细菌 16 S rRNA 引物 533R→27F 进行 454 焦磷酸测序,XL1, XL2, XL3, XL4 获得的有效序列分别为 18 886 条,14 902 条,20 970 条,17 690 条。根据 OTU 相似水平为 0.03,绘制 4 个样品的稀释曲线如图 1。



XL1. 空白组,正常饮食;XL2. 肠道菌群紊乱组,氨苄青霉素 ig 5 g·kg<sup>-1</sup>;XL3. AAD 组,氨苄青霉素灌胃后,用混合艰难梭菌灌胃(菌液密度 8 × 10<sup>7</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>);XL4. 构建 AAD 模型后,用理中汤 7.5 g·kg<sup>-1</sup> 治疗

图 1 空白组、肠道菌群紊乱组、AAD 组和理中汤治疗组的肠道菌群 16 S rRNA 稀释曲线

Fig.1 Rarefaction curves of intestinal flora 16 S rRNA of control group, intestinal flora disorder group, AAD group, Lizhong Tang treatment group

4 个样品的 OTUs 总数共 1 522 个;XL1 的 OTUs 为 860 个,其所特有的 OTUs 共 793 个,丰度最高的一个 OTU 属于拟杆菌门(Bacteroidetes)的普雷沃菌属(*Prevotella*),占该样品整个丰度的 9.1%;XL2 的 OTUs 为 282 个,丰度最高的一个 OTU 属于 γ-变形菌(γ-proteobacteria)的克雷伯菌属(*Klebsiella*),占该样品整个丰度的 37.4%;XL3 的 OTUs 为 385 个;丰度最高的 OTU 为厚壁菌门(Firmicutes)的瘤胃菌属(*Ruminococcaceae*),占该样品整个丰度的 1.88%;XL4 的 OTUs 为 394 个,丰度最高的 Bacteroidetes 的 *Prevotella* 属,占该样品整个丰度的 20.49%。

根据 OTU 相似水平为 0.03, 计算各个样品的相关分析指数如下: 4 个样品用 Chao 1 算法估算 OUTs 的数目 (Chao 指数) 分别为 1 392.11, 380.77, 582.65, 595.38; 估算群落中的多样性指数 (Shannon 指数) 分别为 4.89, 2.13, 2.99, 3.27。

**3.3 基于门水平的肠道菌群组成及变化** XL1, XL2, XL3, XL4 4 个样品均含有的细菌门为放线菌门 (Actinobacteria), 变形菌门 (Proteobacteria), 梭杆菌门 (Fusobacteria), 疣微菌门 (Verrucomicrobia), 厚壁菌门 (Firmicutes), 拟杆菌门 (Bacteroidetes)。

4 个样品丰度最大且变化最为剧烈的细菌门有: Proteobacteria (4 个样品依次为 6.94%, 41.77%, 1.99%, 2.89%), 蓝细菌 (Cyanobacteria) (XL1 为 0.64%; XL2 为 0.01%; XL3, XL4 完全消失), Firmicutes (4 个样品依次为 44.34%, 34.89%, 36.82%, 32.11%), Bacteroidetes (4 个样品依次为 46.6%, 22.74%, 60.8%, 64.49%)。丰度极低的 2 个门芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes, 只含有 1 条序列), 黏胶球形菌门 (Lentisphaerae, 含有 3 条序列), 在 XL2, XL3, XL4 完全消失, 使用抗生素后消失但又恢复的菌群为绿弯菌门 (Chloroflexi), 壁菌门 (Tenericutes), 候选细菌门 (Candidate division, TM7)。在 XL2, XL3, XL4 逐渐消失的细菌为蓝细菌。见图 2。

未分类的细菌 (No Rank) 占 13.73%, 柔嫩梭菌属 (*Faecalibacterium*) 占 6.26%; 巨单胞菌属 (*Megamonas*) 占 5.91%; XL2 共含有 58 个属, 丰度最大的 3 个属为克雷伯菌属占 40.7%, No Rank 占 29.77%, 普雷沃菌属占 20.73%; XL3 共含有 52 个属, 丰度最大的 3 个属为普雷沃菌属占 56.47%, 瘤胃菌属占 22.65%, No Rank 占 4.72%; XL4 共含有 59 个属, 丰度最大的 4 个属为普雷沃菌属占 37.21%, 瘤胃菌属占 17.98%, 副拟杆菌属 (*Parabacteroides*) 占 14.78%, 拟杆菌属 (*Bacteroides*) 占 11.45%, 见图 3。

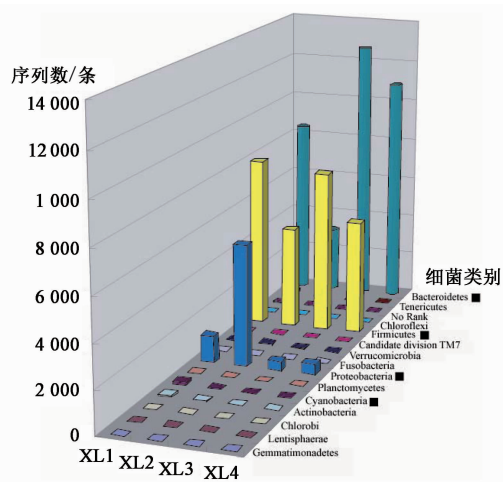
XL2 比 XL1 减少了 43 个属, 新增加了 9 个属; 相比于 XL1, 在 XL2, XL3, XL4 3 个样品中均消失的属共 31 个; 相比于 XL1, 在 XL3 和 XL4 中新增加的属共 9 个; 相比于 XL3, 样品 XL4 减少了 6 个属, 新增加了 13 个属, 且部分属丰度也有较大变化: 拟杆菌属所占比例由 0.23% 增加为 11.45%; 副拟杆菌属所占比例由 3.51% 增加为 14.78%; 萨特菌属 (*Sutterella*) 所占比例由 0.09% 增加为 2.09%。见图 3。

4 个样品基于 16S rRNA 基因序列的差异用微生物生态软件 J- LIBSHUFF 进行 P 值分析时  $P < 0.05$ , 显示 AAD 构建及治疗过程中肠道菌群存在显著性差异。

### 4 讨论

本实验 AAD 小鼠模型建构, 笔者选用了临床使用最为广泛的氨苄青霉素, 先进行肠道菌群紊乱模型的构建, 在灌胃氨苄青霉素的过程中, 实验小鼠出现行动迟缓、畏寒挤缩、饮食下降、被毛糙乱、粪便湿润样等现象; 然后采用 4 种艰难梭菌混合菌液进行灌胃, 直至小鼠出现腹泻, 实验过程符合临床 AAD 的形成过程。

4 个样品 16S rRNA 焦磷酸测序的有效序列均接近 15 000 条, 稀释曲线表明 4 个样品序列均接近饱和 (图 1)。样品 XL1 的 OTUs 为 860 个, 表明动物的正常菌群多样性最高; 样品 XL2 的 OTUs 为 282 个, 表明灌胃抗生素后多样性下降; 灌胃艰难梭菌后 (样品 XL3) 渐有增加, 而理中汤治疗后 (样品 XL4) 多样性和丰度又有进一步的增加, 但尚不能达到 XL1 的水平, 多样性指数 Chao 及丰度指数 Shannon 支持以上的变化趋势。4 个样品, 丰度最高的 3 个 OTUs 均不一样, 反映 4 个样品中细菌多样性和丰度变化显著。



■ 4 个样品中细菌丰度最大且变化最为剧烈的细菌门  
图 2 基于门水平的空白组 (XL1), 肠道菌群紊乱组 (XL2), AAD 组 (XL3) 和理中汤 7.5 g·kg<sup>-1</sup> 治疗组 (XL4) 菌群变化

Fig. 2 Bacterial variation of control group (XL1), intestinal flora disorder group (XL2), AAD group (XL3), Lizhong Tang 7.5 g·kg<sup>-1</sup> treatment group (XL4) based on phylum level

**3.4 基于属水平的组成及变化** XL1 共含有 88 个属, 丰度最大的 3 个属为普雷沃菌属占 38.18%, 尚

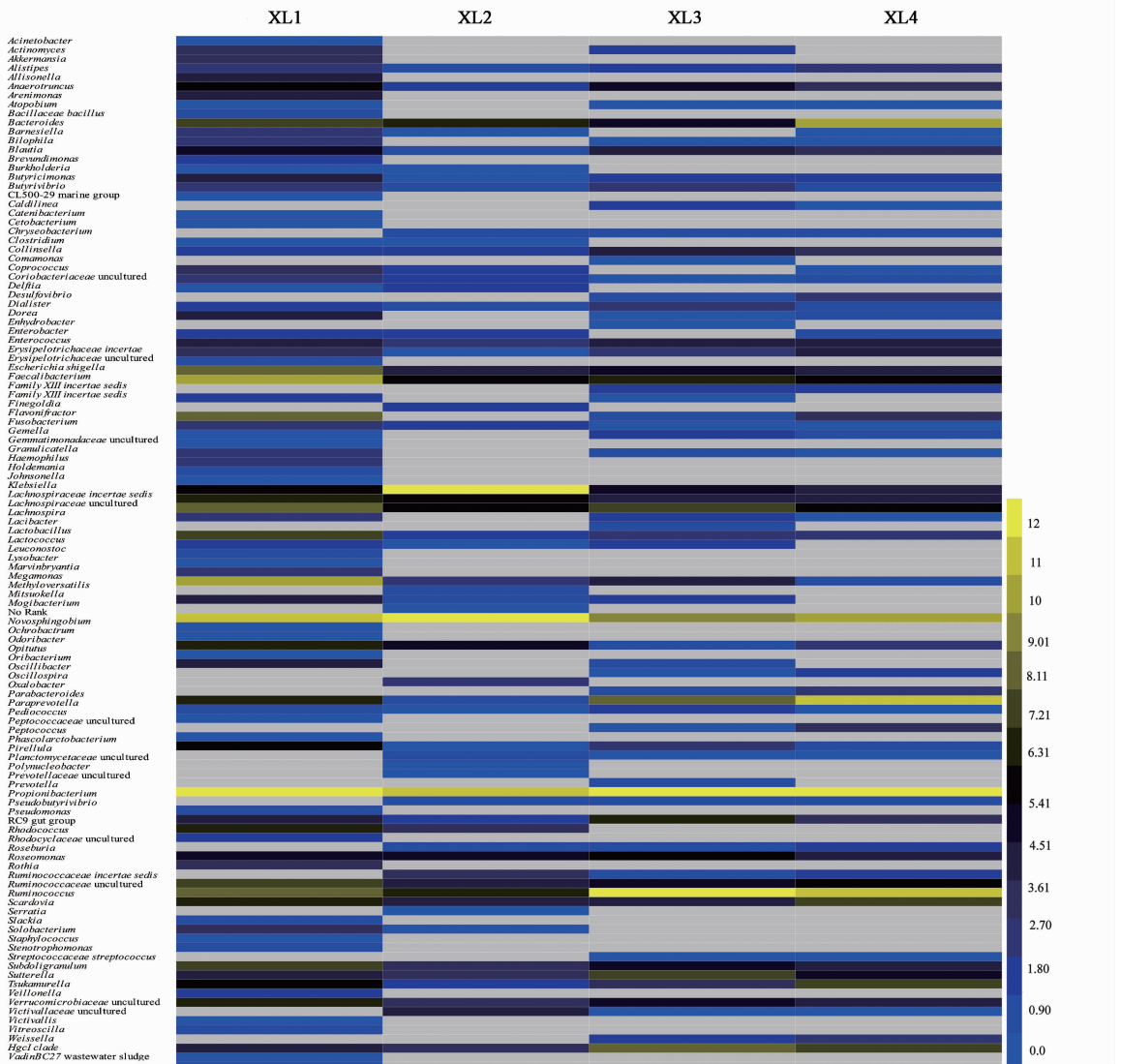


图 3 基于属水平的空白组、肠道菌群紊乱组、AAD 组和理中汤治疗组 Heatmap  
Fig. 3 Heatmap of control group, intestinal flora disorder group, AAD group, Lizhong Tang treatment group based on genus level

以门为单位的细菌组成分析显示:放线菌,变形菌,梭杆菌,疣微菌,厚壁菌,拟杆菌为肠道菌群的重要组成,且贯穿 AAD 构建及治疗的始终;变化最为剧烈的主要细菌门为:变形菌门(变化范围 1.99% ~ 41.77%),厚壁菌门(变化范围 32.11% ~ 44.34%),拟杆菌门(变化范围 22.74% ~ 64.49%);显示拟杆菌门厚壁菌门,变形菌门为实验小鼠肠道最重要的 3 个细菌门,且丰度及多样性变化剧烈(图 2)。而芽单胞菌门,黏胶球形菌门,绿弯菌门,壁菌门,候选细菌门 TM7,蓝细菌等虽然丰度较低,也是模型构建及治疗过程中细菌组成及其多样性变化的重要指标。

以属为单位的细菌组成分析更细致地显示了不同样品的细菌组成及丰度的变化:实验开始前含有 88 个属,灌胃抗生素后减少为 58 个属,灌胃艰难梭

菌后继续减少为 52 个属,而中药治疗后属增加为 59 个。4 个样品中最大丰度的 3 个属也有明显的变化:实验开始前最大丰度的属为普雷沃菌属占 38.18%;灌胃抗生素后演变化为克雷伯菌属占 40.7%;灌胃艰难梭菌后又演变为普雷沃菌属占 56.47%;中药治疗后仍为普雷沃菌属占 37.21%(图 3)。该结果显示普雷沃菌属为实验过程中最重要的属,提示普雷沃菌属与 AAD 的发生及治疗有着密切的联系。

临床上 AAD 的发生,先是抗生素破坏了肠内菌群的自然生态平衡,随后致病菌的感染进一步恶化肠内菌群微生态系统失衡从而导致该病而引起 AAD。中药复方理中汤对 AAD 的治疗,包括对宿主肠道菌群的“正气”恢复<sup>[8-9]</sup>。本实验中,XL1 代表正常小鼠的肠道菌群,丰度及多样性均为最高;灌胃

抗生素后,肠道菌群破坏,大量的革兰阳性菌属消失(减少了 43 个属),厚壁菌和拟杆菌丰度减少,而变形菌门的克雷伯菌属等致病菌属丰度显著上升(图 2,3),与临床 AAD 产生的外因效果吻合;灌胃艰难梭菌后,按 AAD 产生的过程,理论上肠道菌群应该更进一步破坏<sup>[3-4]</sup>,实验中此阶段的肠道菌群属水平上的数量减少为 52 个,为最少(见图 3),但厚壁菌,拟杆菌,及基于 OTUs 的多样性及丰度有增加,基于门及 OTUs 的数据与理论上肠道菌群应该更进一步破坏的预期有差距,原因可能是本实验用的艰难梭菌为医院的临床分离株,与构建 AAD 小鼠模型的理想致病菌源尚有差距;即便如此,相比于灌胃艰难梭菌后的肠道菌群,理中汤治疗后肠道菌群结构又产生了有一定的变化(如厚壁菌丰度减少,拟杆菌增加等,见图 2),属的水平上总体数量增加了 7 个属(图 3),且 OTUs,Chao 指数,Shannon 指数等均有增加,且从已有效序列来看 XL4 为 17 690 条,小于 XL3 的 20 970 条,理论上 XL4 应该具有更高的多样性,以上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。

本研究主要是从肠道菌群变化去探讨 AAD 模型构建及理中汤的治疗,尚缺少结肠黏膜等病理学、小肠吸收功能等方面的研究,这是 AAD 模型及理中汤治疗微生态机制评价待进一步深入研究的领域。

#### [参考文献]

[ 1 ] Hogenauer C, Hammer H F, Krejs G J, et al. Mechanisms and management of antibiotic-associated diarrhea [J]. Clin Infect Dis, 1998,27(4):702-710.  
[ 2 ] Harbarth S, Samore M H, Carmeli Y. Antibiotic prophylaxis and the risk of Clostridium difficile-associated diarrhoea [J]. J Hosp Infect, 2001,48(2):93-97.  
[ 3 ] Surawicz C M. The microbiota and infectious diarrhea [J]. Gastroenterol Clin Biol, 2010,34(4):31-40.

[ 4 ] 王占国. 中医“脾”与消化道正常菌群 [J]. 中国微生物学杂志,1991,3(2):65-68.  
[ 5 ] 陈延. 升脾阳法与养胃阴法对脾胃学说形成的理论探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):181-182.  
[ 6 ] 丁维俊,周邦靖. 参苓白术散对小鼠脾虚模型肠道菌群的影响 [J]. 北京中医药大学学报,2006,29(8):530-533.  
[ 7 ] 楼淑瑾. 抗生素相关性腹泻相关因素与对策 [J]. 辽宁中医药大学学报,2006,8(6):120-121.  
[ 8 ] 刘勇,陈娟. 参苓白术散治疗小儿秋季腹泻 45 例 [J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):181-182.  
[ 9 ] 唐汉庆. 附子理中汤对脾阳虚证大鼠血糖、甘油三酯及总胆固醇的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(15):230-233.  
[ 10 ] 段永强,程卫东,成映霞,等. 四君子汤和理中汤干预腹泻型 IBS 大鼠胃肠转运功能和 P 物质、胆囊收缩素的比较研究 [J]. 中成药,2015,37(2):405-408.  
[ 11 ] 舒青龙,葛来安,谢燕飞,等. 中药复方对抗生素相关性腹泻微生态药理的研究进展 [J]. 中国微生物学杂志,2012,24(5):457-459.  
[ 12 ] Quince C, Lanzen A, Curtis T P, et al. Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data [J]. Nat Methods, 2009,6(9):639-U27.  
[ 13 ] 舒青龙,徐刚,叶荷平,等. 参苓白术散对体外艰难梭菌生长的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(2):258-262.  
[ 14 ] 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):145-149.  
[ 15 ] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities [J]. Appl Environ Microbiol, 2009,75(23):7537-7541.

[责任编辑 聂淑琴]