

乌梅散对菌群失调性腹泻小鼠肠道乳糖酶活性及 菌群多样性的影响

苗小雨¹, 王亚静^{1*}, 赵鑫^{2*}, 张紫千¹, 席素曼¹, 赵森¹

(1. 天津中医药大学现代中药发现与制剂技术教育部工程研究中心, 天津 301617;

2. 天津中医药大学方剂学教育部重点实验室, 天津 301617)

[摘要] 目的:探究乌梅散对菌群失调性腹泻小鼠的乳糖酶活性和肠道菌群多样性的影响。方法:将小鼠随机分为4组,分别为正常组、模型组及乌梅散低、高剂量组,每组8只。采用混合抗生素灌胃造模7 d,乌梅散低、高剂量组灌胃乌梅散(5.98、11.96 g·kg⁻¹)连续给药7 d,正常组与模型组给予等体积无菌水。记录小鼠腹泻情况、体质量、摄食量的变化,末次给药后收集粪便采用比色法测定乳糖酶活性,并运用16S rRNA高通量测序技术检测并分析肠道菌群的变化。结果:与正常组比较,模型组小鼠大便稀软,体质量减轻、摄食量减少,乳糖酶活性降低,肠道菌群多样性明显降低,菌群相对丰度门、属水平均发生明显变化。与模型组比较,乌梅散降低了小鼠的腹泻率并促使体质量及摄食量快速回升,升高了抗生素所降低的乳糖酶活性,提高菌群失调小鼠的群落丰富度、多样性,并促使物种组成向正常组靠近;乌梅散给药组回调了菌群失调性腹泻小鼠的3种差异菌门(拟杆菌门、变形菌门、疣微菌门)与9种差异菌属(臭气杆菌属、肠杆菌属、无害梭菌属等),其中 *norank f Muribaculaceae* 属、*norank f norank o Clostridia UCG-014* 属、*Lachnospiraceae NK4A136 group* 属、臭气杆菌属与体质量、乳糖酶活性呈显著正相关,大肠埃希菌-志贺菌属、肠杆菌属、肠球菌属、无害梭菌属与腹泻率呈显著正相关。功能预测发现,高剂量乌梅散能明显回调富集过高的新陈代谢、遗传信息处理、人类疾病等6个功能水平,对内分泌代谢病、免疫性疾病、寄生虫传染性等疾病等有积极影响。结论:乌梅散能缓解菌群失调性腹泻的症状,其机制可能是通过提高乳糖酶活性、调节肠道菌群结构而实现。

[关键词] 乌梅散; 菌群失调性腹泻; 肠道菌群; 乳糖酶; 高通量测序

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)04-0033-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221906 **[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.20221019.1048.002.html>

[网络出版日期] 2022-10-21 14:01:09

Effect of Wumeisan on Gut Lactase Activity and Microflora Diversity of Mice with Dysbacteriosis Diarrhea

MIAO Xiaoyu¹, WANG Yajing^{1*}, ZHAO Xin^{2*}, ZHANG Ziqian¹, XI Suman¹, ZHAO Sen¹

(1. Engineering Research Center of Modern Chinese Medicine Discovery and Preparation Technique, Ministry of Education, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Tianjin 301617, China;

2. Ministry of Education Key Laboratory of Pharmacology of Traditional Chinese Medical Formulae, Tianjin University of TCM, Tianjin 301617, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of Wumeisan on gut lactase activity and microflora diversity of mice with dysbacteriosis diarrhea. **Method:** The mice were randomly divided into 4 groups, namely, the normal group, the model group, and the low-dose and high-dose Wumeisan groups, with 8 mice in

[收稿日期] 2022-07-27

[基金项目] 国家中医药管理局中医药创新团队及人才支持计划项目(ZYYCXTD-C-202009);国家自然科学基金项目(81803959);天津市科技计划项目(19ZYPTJC00060,18ZXXYSY00130)

[第一作者] 苗小雨,在读硕士,从事药物制剂与新药开发研究,E-mail: mmiaoxiaoyu@163.com

[通信作者] *王亚静,硕士,研究员,从事药物制剂与新药开发研究,Tel:022-59596169,E-mail:yajing022@163.com;

*赵鑫,博士,副研究员,从事中药微生物组学研究,E-mail:x.zhao26@tjutc.edu.cn

each group. The mouse model was made by gavage of mixed antibiotics for 7 d, and the low-dose and high-dose Wumeisan groups (5.98, 11.96 g·kg⁻¹) were given gavage for 7 d continuously. The normal group and the model group were given the same volume of sterile water. The changes in the body weight, food intake, and diarrhea of mice were recorded. Feces were collected after the last administration, and the lactase activity was detected by the colorimetric method. The gut microbiota changes were detected by the 16S rRNA high-throughput sequencing technology. **Result:** Compared with those in the normal group, the mice in the model group had dilute and soft stools, reduced body mass, reduced food intake, reduced lactase activity, significantly reduced intestinal flora diversity, and significant changes in the relative abundance phylum and genus levels of flora. Compared with the model group, Wumeisan reduced the diarrhea rate of mice, promoted the rapid recovery of body weight and food intake, increased the lactase activity decreased by antibiotic, improved the community abundance and diversity of mice with dysbacteriosis, and made the species composition closer to that in the normal group. The abundance of three phyla (Bacteroidota, Proteobacteria, Verrucomicrobiota) and nine genera (*Odoribacter*, *Enterococcus*, *Clostridium innocuum* group, etc.) of mice with diarrhea were regulated by Wumeisan. Among them, *norank f Muribaculaceae*, *norank f norank o Clostridia UCG-014*, *Lachnospiraceae NK4A136* group, and *Odoribacter* showed significant positive correlation with the body weight and lactase activity, and *Escherichia-Shigella*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, and *Clostridium innocuum* group showed significant positive correlation with the diarrhea rate. Function prediction showed that the high-dose Wumeisan significantly reseted 6 functional levels of metabolism, genetic information processing, and human diseases, and had positive effects on endocrine and metabolic diseases, immune diseases, infectious disease, and parasitic infectious diseases. **Conclusion:** Wumeisan can relieve the symptoms of dysbacteriological diarrhea by increasing the lactase activity and regulating the gut microbiota composition.

[Keywords] Wumeisan; dysbacteriological diarrhea; gut microbiota; lactose; high-throughput sequencing

菌群失调是指由感染或暴露于抗生素或毒素、炎症、免疫缺陷等所引起的肠道菌群组成的改变,临床主要表现为腹泻、腹痛、腹胀等症状,其中以菌群失调性腹泻尤为明显,已成为一种常见疾病^[1-2]。研究表明,肠道菌群失调与腹泻互为因果,任何一种腹泻都伴有肠道菌群失调,肠道菌群失调也会导致和加重腹泻^[3]。

此外,肠道菌群及其编码分泌的肠道活性酶,均属于肠道微生态系统的重要组成部分^[4]。研究表明,肠道菌群失调、肠道酶活性变化等都能对肠道微生态造成影响,导致腹泻的发生^[5]。其中乳糖酶作为小肠吸收消化功能的标志酶,腹泻的过程中普遍存在的菌群多样性降低、肠道黏膜破坏、胃肠动力障碍等都会降低乳糖酶活性;反之,缺乏乳糖酶或其酶活性被抑制时,机体则出现乳糖酶不耐受,进而引起腹胀、腹泻^[6-7]。可见,菌群失调性腹泻与肠道菌群、乳糖酶活性等微生态变化存在一定的相关性。

乌梅散收载于我国现存的第一部成药药典《太平惠民和剂局方》,应用历史悠久,由乌梅肉、白茯

苓、干木瓜、生姜组成,治小儿下痢后津液减少,脏腑虚燥,烦渴饮引,及治诸病烦渴,引饮无度^[8]。小儿下痢,对应现代医学概念为小儿腹泻,组方中的乌梅、茯苓、生姜等在临床多应用于预防、治疗多种腹泻及溃疡性结肠炎^[9-12],但目前尚无乌梅散缓解腹泻机制及对菌群失调性腹泻有关影响的报道。故本研究以混合抗生素构建小鼠菌群失调性腹泻的模型,从行为学、肠道微生态2个角度探究乌梅散对小鼠一般情况、乳糖酶活性、肠道菌群失调的影响,为乌梅散在微生态调节剂方面的应用提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性BALB/c小鼠32只,5~6周龄,体质量(20±2)g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,合格证号SCXK(京)2019-0008。本实验经天津中医药大学实验动物伦理委员会审核批准,伦理审查编号TCM-LAEC2021205,遵循相关规定和要求。

1.2 药物与试剂 乌梅(批号20210501)、茯苓(批号20211101)、木瓜(批号20210902)均购自北京同

仁堂(集团)有限责任公司;生姜(批号20211119)购自天津市红旗农贸综合批发市场;氨苄西林、磷酸新霉素、甲硝唑、盐酸万古霉素、磷酸盐缓冲液(PBS,北京索莱宝科技有限公司,批号分别为325P021、910J053、125N023、716R026、20211124);BCA蛋白浓度测定试剂盒(增强型,上海碧云天生物技术有限公司,批号090120201214);乳糖酶试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号20220104)。

1.3 仪器 Milli-Q型超纯水处理器(美国MilliPore公司);ZDHW型调温电热套(北京中兴伟业仪器有限公司);EYELA N-1100型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司);Alpha2-4 LSCbasic型冷冻干燥机(德国Christ公司);KQ-400KDE型高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);VX-200型涡旋仪(美国Labnet公司);Heraeus Pico17型微量高速离心机[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];HH-2型数显恒温水浴锅(常州越新仪器制造有限公司);Spark型多功能酶标仪(瑞士Tecan公司)。

2 方法

2.1 药液制备 依照《太平惠民和剂局方》记载的乌梅散各药比例、用法^[8],将乌梅肉、白茯苓、干木瓜、生姜按3:6:6:8进行粉碎、混合、装入圆底烧瓶,加入6倍量纯化水,水回流提取2 h,滤液在60℃下旋转蒸发浓缩至含生药质量浓度1 g·mL⁻¹,冷冻干燥后得到乌梅散冻干粉备用。根据所需生药量计算冻干粉的质量,精密称取冻干粉,溶于相应体积的纯化水中,超声辅助溶解后得到乌梅散药液备用。

2.2 造模、分组与给药 将32只5~6周龄BALB/c雄性小鼠随机分成4组,分别为正常组、模型组、乌梅散低、高剂量组,每组8只小鼠。参照文献[13-16]并加以改良,以混合抗生素溶液(氨苄西林25 mg·kg⁻¹、甲硝唑25 mg·kg⁻¹、新霉素25 mg·kg⁻¹、万古霉素12.5 mg·kg⁻¹)构建小鼠肠道菌群失调腹泻模型。正常组灌胃无菌水,其余各组灌胃混合抗生素溶液,灌胃量按10 mL·kg⁻¹体质量计,1次/d,第1至7天连续灌胃7 d后进行评估,用腹泻率检验造模是否成功,随后给药。依据《中华人民共和国药典》推荐的各味药用量结合古方中比例^[8]换算,推算出人体每日摄入乌梅散的量为46 g生药,按人(70 kg)和小鼠体表面积(20 g)换算小鼠乌梅散的等效剂量。乌梅散低剂量组按临床等效剂量给药(5.98 g·kg⁻¹·d⁻¹),乌梅散高剂量组按2倍等效剂量给药(11.96 g·kg⁻¹·d⁻¹),正常组与模型组灌胃等体积

无菌水,灌胃量按10 mL·kg⁻¹体质量计,1次/d,第8至14天连续灌胃7 d。

2.3 实验指标

2.3.1 一般情况 每天灌胃前观察小鼠的精神及外观状态。分别于第0天、第4天、第7天(造模完成)、第11天、第14天(给药完成)的固定时间,记录每组的腹泻动物数、小鼠体质量及24 h摄食量,并计算给药期小鼠的体质量增长率。以滤纸上有痕迹为腹泻的标准。

腹泻率=该组腹泻动物数/该组动物总数×100%;

给药期体质量增长率=(第14天体质量-第7天体质量)/第7天体质量×100%。

2.3.2 粪便采集 末次给药后收集各组小鼠的新鲜粪便,置-80℃冰箱保存备用。

2.3.3 乳糖酶活性测定 小鼠粪便中加入PBS(pH 7.4)涡旋震荡5 min后于1万r·min⁻¹离心10 min(离心半径5.5 cm),取上清液,采用比色法按照说明书进行乳糖酶活性的测定。测定原理为:乳糖酶作用于相应的底物产生单糖,该单糖在其氧化酶的作用下产生过氧化氢,过氧化氢同显色剂产生红色的产物,用酶标仪测定其吸光度A,从而测定出乳糖酶活性。乳糖酶活力单位定义为在37℃ pH 6.0的条件下,每1 mg小鼠粪便每1 min水解1 nmol乳糖定义为1个酶活力单位。

2.3.4 菌群高通量测序 从每组中随机选出6个粪便样本,委托上海美吉生物医药科技有限公司进行微生物多样性的检测。该公司使用DNA提取试剂盒提取粪便样本总DNA提取并检测其提取质量,基于338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')-806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对16S rRNA基因V3-V4可变区进行PCR扩增,平均片段长度为420 bp,纯化与定量后基于Illumina MiSeq PE300平台进行测序。测序结果进行双端序列质控拼接后得到优化序列,优化序列基于silva138/16s_bacteria物种分类数据库按97%相似度进行OTU聚类分析(置信度为0.7),按最小样本序列数抽平生成OTU物种分类统计表格。在Qiime平台(<https://qiime.org>)进行物种数量分析、Alpha多样性分析、Beta多样性分析、群落组成分析、标志菌群LefSe分析、环境因子关联分析、功能预测并绘图。

2.4 统计学分析 采用统计分析软件SPSS 21.0处理得到的数据,数据结果均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐时以最小显著性差异

法(LSD)检验方法进行两两比较,方差不齐时采用Dunnett's 检验方法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义,运用 GraphPad Prism 8.0.2 进行绘图。

3 结果

3.1 一般情况

3.1.1 精神及外观状态 正常组小鼠精神状态始终良好,毛发光滑,尾部肛口处干净未见红肿。造模期间,造模各组小鼠自第4天开始出现腹泻,精神低迷;至第7天,造模各组小鼠精神萎靡,毛发脏乱,尾部肛门红肿。给药期间,模型组小鼠毛发仍然杂乱,精神萎靡,肛口处红肿;给药各组小鼠腹泻情况好转,精神状态逐渐恢复。

3.1.2 腹泻率 除正常组外,混合抗生素造模小鼠于第4天起均出现腹泻症状;至第7天,造模组小鼠出现不同程度的腹泻,大便呈粒状,但“稀湿”,颜色变浅,呈黄色,能轻易捏碎,碎后易粘手,造模组腹泻率达到100%,表明造模成功。给药期末,模型组小鼠粪便部分恢复正常,部分为略稀湿的软便,个别小鼠甚至水样便;乌梅散低、高剂量组粪便颜色恢复正常黑色,无稀湿状态,起效速度为乌梅散低剂量组>乌梅散高剂量组。见表1。

3.1.3 体质量和摄食量 造模期,除正常组外,造

表1 乌梅散对菌群失调性腹泻小鼠腹泻率的影响

Table 1 Effect of Wumeisan on diarrhea rate of mice with dysbacteriosis diarrhea

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	各组腹泻率/%				
		第0天	第4天	第7天	第11天	第14天
正常组		0	0	0	0	0
模型组		0	100	100	37.5	37.5
乌梅散低剂量组	5.98	0	100	100	12.5	0
乌梅散高剂量组	11.96	0	87.5	100	37.5	0

模各组小鼠的体质量受抗生素影响急剧下降,至第7天与正常组小鼠比较差异有显著统计学意义($P < 0.01$);给药期,与模型组比较,乌梅散低、高剂量组均提高了小鼠的体质量增长率,其中乌梅散高剂量组的体质量增长率与模型组已有统计学意义上差异($P < 0.05$),明显加快了小鼠体质量向正常水平趋近的速度。见表2。

造模期,与正常组比较,造模各组小鼠的摄食量明显下降;给药期,模型组第11天摄食量仍明显低于正常组,至第14天才开始回升,而乌梅散给药各组在第11天即上升至与正常组相近的摄食量,可见乌梅散能加快小鼠摄食量的恢复速度。见表3。

表2 乌梅散对菌群失调性腹泻小鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effect of Wumeisan on body weight of mice with dysbacteriosis diarrhea ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	体质量/g					给药期体质量增长率/%
		第0天	第4天	第7天	第11天	第14天	
正常组		20.78±1.10	21.67±1.21	22.38±1.16	22.98±1.31	23.40±1.17	4.57±2.35
模型组		20.82±0.13	20.43±0.42	20.07±0.45 ²⁾	21.00±0.74	21.10±1.13	5.13±4.62
乌梅散低剂量组	5.98	20.33±0.52	19.63±0.84	19.03±0.61	19.92±1.55	20.43±0.89	7.20±3.93
乌梅散高剂量组	11.96	20.95±1.08	20.48±1.06	19.67±1.71	21.27±0.90	21.64±1.56	9.99±3.78 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表4-表8同)

表3 乌梅散对菌群失调性腹泻小鼠摄食量的影响

Table 3 Effect of Wumeisan on food intake of mice with dysbacteriosis diarrhea

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	各组摄食量/g				
		第0天	第4天	第7天	第11天	第14天
正常组		23.3	25.4	26.1	23.7	25.3
模型组		26.9	16.6	19.3	16.1	27.2
乌梅散低剂量组	5.98	22.9	11.9	18.8	25.0	25.0
乌梅散高剂量组	11.96	22.6	17.5	15.0	21.4	22.0

3.2 乳糖酶活性 受混合抗生素灌胃的影响,与正常组比较,模型组的乳糖酶活性显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,乌梅散低剂量组的乳糖酶活性明显

提高($P < 0.05$),向正常组靠近;乌梅散高剂量组的乳糖酶活性同样显著提高($P < 0.01$),提高程度高于乌梅散低剂量组。见表4。

表4 乌梅散对菌群失调性腹泻小鼠乳糖酶活性的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 4 Effect of Wumeisan on lactase activity of mice with dysbacteriosis diarrhea ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	乳糖酶活性/U·mg ⁻¹
正常组		48.55±10.13
模型组		6.77±1.27 ²⁾
乌梅散低剂量组	5.98	21.07±2.15 ³⁾
乌梅散高剂量组	11.96	65.61±9.22 ⁴⁾

3.3 肠道菌群多样性

3.3.1 物种数量分析 基于97%阈值下的相似性,将高质量序列聚类成570个OTU(经过质量过滤),正常组、模型组、乌梅散低、高剂量组的总OTU数目分别为516、168、222、337。模型组的OTU数目与正常组比较有显著差异($P<0.01$),乌梅散高剂量组显著提高了OTU数目($P<0.01$),见表5;乌梅散高剂量组与正常组的重叠最多,即共有OTU最多、最为相似,其次是乌梅散低剂量组,最后是模型组;抗生素明显影响了小鼠的肠道菌群物种数量,使模型组的OTU数目显著降低,而低、高剂量的乌梅散可以在不同程度上提高菌群失调小鼠的物种数目。见增强出版附加材料。

表5 乌梅散对菌群失调性腹泻小鼠肠道菌群总OTU数目的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of Wumeisan on total OTU number in gut microbiota of mice with dysbacteriosis diarrhea ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	OTU数目/个
正常组		356.50±31.77
模型组		60.33±43.55 ²⁾
乌梅散低剂量组	5.98	77.50±69.01
乌梅散高剂量组	11.96	151.00±60.81 ⁴⁾

表6 乌梅散对菌群失调性腹泻小鼠肠道菌群Alpha多样性的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 Effect of Wumeisan on Alpha diversity in gut microbiota of mice with dysbacteriosis diarrhea ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	Sobs指数	Shannon指数	Simpson指数
正常组		356.50±31.77	3.67±0.38	0.07±0.03
模型组		35.75±25.59 ²⁾	2.07±0.52 ²⁾	0.17±0.07 ²⁾
乌梅散低剂量组	5.98	77.50±69.01	2.39±0.18	0.16±0.04
乌梅散高剂量组	11.96	174.60±21.10 ³⁾	2.93±0.36 ⁴⁾	0.10±0.04 ³⁾

3.3.3 β 多样性分析 PCoA分析为主坐标分析,基于Bray-Curtis距离矩阵作图,通过降维找出影响样本群落组成差异的潜在主成分。组间的物种组成越相似,图上的距离越近。PCoA分析结果显示,第一主成分PCoA1解释组间38.8%的差异,第二主成分PCoA2解释组间19.2%的差异,同时组间相似性分析(ANOSIM)显示 $R=0.46, P<0.01$;正常组与模型组距离最远,差异最大,表明造模成功,抗生素已明显改变小鼠肠道菌群的物种组成;乌梅散的2个给药组介于两组之间,并且具有向正常组靠拢的趋势,其中乌梅散高剂量组与正常组距离最近,已与正常组物种组成产生交集。见增强出版附加材料。

3.3.4 门水平物种组成分析 门水平物种丰度结果显示,小鼠肠道菌群中的优势物种主要有厚壁菌

3.3.2 α 多样性分析 依据抽平后的OTU表格,在OTU水平上通过Sobs指数、Shannon指数、Simpson指数分析群落丰富度、群落多样性。结果反映群落覆盖率均已 >0.99 ,说明本次测序结果代表样本中微生物的真实情况。

Sobs指数越高,说明群落丰富度越高。正常组的Sobs指数最高,与其余各组有显著的统计学差异($P<0.01$),说明抗生素显著降低了小鼠肠道菌群的丰富度;相较于自然恢复的模型组,乌梅散低、高剂量组均在一定程度上提高了群落Sobs指数,其中乌梅散高剂量组的Sobs指数与模型组已有统计学意义上差异($P<0.05$),高剂量乌梅散明显提高了抗生素所降低的群落丰富度。见表6。

Shannon指数和Simpson指数共同反映群落的多样性,Shannon指数与群落多样性呈正相关,Simpson指数与群落多样性呈负相关。模型组Shannon指数和Simpson指数均与正常组有显著差异($P<0.01$),乌梅散高剂量组明显回调了Shannon指数和Simpson指数($P<0.05, P<0.01$)。可见,抗生素造模使小鼠肠道菌群的群落多样性大幅降低,高剂量乌梅散对于多样性的提高有显著作用。见表6。

门(Firmicutes, F)、拟杆菌门(Bacteroidota, B)、变形菌门(Proteobacteria)、疣微菌门(Verrucomicrobiota)、放线菌门(Actinobacteriota)、弯曲杆菌门(Campilobacterota)、脱硫杆菌门(Desulfobacterota)。

与正常组比较,模型组的厚壁菌门与拟杆菌门的比例(F/B值)显著升高($P<0.01$),乌梅散给药后有效降低了肠道菌群中升高的F/B值($P<0.01$)。与正常组比较,抗生素使模型组拟杆菌门群落相对丰度显著降低($P<0.01$),变形菌门、疣微菌门相对丰度明显升高($P<0.05$);与模型组比较,乌梅散给药组拟杆菌门的相对丰度均显著升高($P<0.01$),乌梅散低剂量组的疣微菌门相对丰度显著降低($P<0.01$),乌梅散高剂量组降低了异常增高的变形菌门丰度。

见增强出版附加材料。

3.3.5 属水平物种组成分析 在属分类水平上, 4组小鼠中相对丰度极高(>5%)的菌属主要有23种, 包括乳杆菌属(*Lactobacillus*)、*norank f Muribaculaceae*属、拟杆菌属(*Bacteroides*)、布劳特氏菌属(*Blautia*)、阿克曼氏菌属(*Akkermansia*)、大肠埃希菌-志贺氏菌属(*Escherichia-Shigella*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、*Alistipes*属、*norank f norank o Rhodospirillales*属、*Lachnospiraceae NK4A136 group*属、*norank f norank o Clostridia UCG-014*属、*Parasutterella*属、臭气杆菌属(*Odoribacter*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、*Prevotellaceae UCG-001*属、*unclassified f Lachnospiraceae*属、副杆菌属(*Parabacteroides*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、无害梭菌属(*Clostridium innocuum group*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、*Erysipelatoclostridium*属、*Dubosiella*属、*Alloprevotella*属。

与正常组比较, 模型组小鼠 *norank f Muribaculaceae*属、*norank f norank o Clostridia UCG-014*属、*Lachnospiraceae NK4A136 group*属、臭气杆菌属等4种菌属丰度明显降低($P<0.05$, $P<0.01$), 阿克曼氏菌属、大肠埃希菌-志贺氏菌属、肠杆菌属、肠球菌属、无害梭菌属等5种菌属丰度明显升高($P<0.05$, $P<0.01$); 相较于模型组, 乌梅散低剂量组阿克曼氏菌属、大肠埃希菌-志贺氏菌属、肠杆菌属、肠球菌属、无害梭菌属群落丰度显著降低($P<0.05$, $P<0.01$); 相较于模型组, 乌梅散高剂量组 *norank f Muribaculaceae*属、*norank f norank o Clostridia UCG-014*属、*Lachnospiraceae NK4A136 group*属丰度明显升高($P<0.05$), 臭气杆菌属丰度也在一定程度上提高, 肠杆菌属、肠球菌属、无害梭菌属群。见增强出版附加材料。

3.3.6 标志菌群 LefSe 分析 采用线性判别分析在不同组间具有统计学差异的标志菌群($P<0.05$, $P<0.01$)。LefSe分析结果显示, 4组均存在丰度差异明显的物种。*norank f Muribaculaceae*属、*norank f norank o Clostridia UCG-014*属、*Lachnospiraceae NK4A136 group*属、*Prevotellaceae UCG-001*属等物种在正常组中富集; 大肠埃希菌-志贺氏菌属、肠杆菌属、肠球菌属、无害梭菌属等物种在模型组中富集; 拟杆菌属、*Parasutterella*属、克雷伯氏菌属、副拟杆菌属等物种在乌梅散低剂量组中富集; 双歧杆菌属等物种在乌梅散高剂量组中富集。见增强出版附加材料。

3.3.7 环境因子关联分析 将腹泻率、体质量、乳糖酶活性作为环境因子, 进行环境因子、样本、菌群三者之间的相关性分析。线性模型(RDA)/单峰模型(CCA)相关性分析是基于两种模型选择开展, 即RDA或CCA, 该分析图可以直观地看出样本分布和环境因子间的关系。体质量和乳糖酶活性所夹的锐角表明体质量和乳糖酶活性之间呈正相关, 而与腹泻率所夹的钝角表明体质量、乳糖酶活性和腹泻率之间均呈负相关; 从样品点向环境因子的箭头做投影, 根据投影点距离原点的距离发现体质量和乳糖酶活性对正常组、乌梅散高剂量组影响最大, 腹泻率对模型组影响最大。

选取属分类水平总丰度前20的物种, 分析环境因子与物种之间的 Spearman 相关性系数, 通过颜色变化反映两者之间的正负关系, 将获得的数值矩阵通过 Heatmap 图直观展示。腹泻率与大肠埃希菌-志贺氏菌属、肠球菌属、肠杆菌属、无害梭菌属呈显著正相关($P<0.05$, $P<0.01$), 与 *Parasutterella*属、副拟杆菌属(*Parabacteroides*)、*norank f norank o Clostridia UCG-014*属呈负相关($P<0.05$, $P<0.01$); 体质量与 *Lachnospiraceae NK4A136 group*属、*Prevotellaceae UCG-001*属、*norank f Muribaculaceae*属、*norank f norank o Clostridia UCG-014*属、臭气杆菌属呈正相关($P<0.05$, $P<0.01$), 与肠球菌属、肠杆菌属、无害梭菌属呈负相关($P<0.05$), 与大肠埃希菌-志贺氏菌属同样呈现负相关, 但相关性不显著; 乳糖酶活性与 *Lachnospiraceae NK4A136 group*属、*Prevotellaceae UCG-001*属、*norank f Muribaculaceae*属、*norank f norank o Clostridia UCG-014*属、臭气杆菌属、*Alistipes*属呈正相关($P<0.05$, $P<0.01$), 与肠杆菌属、无害梭菌属呈负相关($P<0.05$, $P<0.01$), 与大肠埃希菌-志贺氏菌属、肠球菌属同样呈现负相关, 但相关性不显著。见增强出版附加材料。

3.3.8 PICRUST 功能预测 根据京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库的信息对样本中微生物群落的功能组成进行 PICRUST 预测, 并通过 OTU 丰度计算各功能类别的丰度。样本在一级功能层(level 1)共获得6类功能类别: 新陈代谢(Metabolism)、遗传信息处理(Genetic Information Processing)、环境信息处理(Environmental Information Processing)、细胞过程(Cellular Processes)、人类疾病(Human Diseases)、有机系统(Organismal Systems)。模型组各个功能的丰度均在不同程度上高于正常组; 低剂量乌梅散对于各功能丰度的异常升高改变较小, 整体丰度

更接近模型组,甚至高于模型组;高剂量乌梅散回调了过高的功能丰度。其中模型组的人类疾病功能丰度显著高于正常组($P<0.01$),而高剂量乌梅散给药后人类疾病的丰度显著降低($P<0.01$)。见表7。

在二级功能层进一步区分,发对样本功能富集在全局和总览图(Global and overview maps)、碳水化合物代谢(Carbohydrate metabolism)、氨基酸代谢(Amino acid metabolism)、能量代谢(Energy metabolism)、膜运输(Membrane transport)等45个功能通路。与正常组比较,抗生素使模型组的核苷酸代谢(Nucleotide metabolism)、脂类代谢(Lipid

metabolism)、复制和修复(Replication and repair)、翻译(Translation)、折叠定位和降解(Folding, sorting and degradation)、抗肿瘤药耐药性(Drug resistance: antineoplastic)、内分泌代谢病(Endocrine and metabolic disease)、免疫性疾病(Immune disease)、寄生虫传染性疾病(Infectious disease: parasitic)的丰度明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,高剂量的乌梅散在不同程度上降低了这些功能丰度的异常升高($P<0.05$, $P<0.01$),至其与正常水平差异无统计学意义。见表8。

表7 乌梅散对菌群失调性腹泻小鼠肠道菌群一级功能丰度的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 7 Effect of Wumeisan on first-order functional abundance in gut microbiota of mice with dysbacteriosis diarrhea ($\bar{x}\pm s, n=6$) $\times 10^6$

组别	剂量/g·kg ⁻¹	新陈代谢	遗传信息处理	环境信息处理	细胞过程	人类疾病	有机系统
正常组		32.73±2.65	4.16±0.50	2.58±0.43	1.57±0.17	1.49±0.16	0.76±0.05
模型组		66.25±19.87	5.29±1.21 ¹⁾	5.31±2.49	2.87±1.16	2.84±0.61 ²⁾	1.19±0.36
乌梅散低剂量组	5.98	60.08±12.98	6.03±0.81	5.51±1.10	3.35±0.69	2.54±0.64	1.46±0.31
乌梅散高剂量组	11.96	49.94±14.66	4.61±0.70	4.25±1.71	2.46±0.87	1.85±0.48 ⁴⁾	1.10±0.28

表8 乌梅散对菌群失调性腹泻小鼠肠道菌群二级功能丰度的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 8 Effect of Wumeisan on secondary functional abundance in gut microbiota of mice with dysbacteriosis diarrhea ($\bar{x}\pm s, n=6$) $\times 10^3$

组别	剂量/g·kg ⁻¹	核苷酸代谢	脂类代谢	复制和修复	翻译	折叠定位和降解
正常组		1365.05±169.49	899.15±91.05	1 564.85±193.27	1 790.35±220.34	716.23±73.45
模型组		2 312.58±374.31 ²⁾	1 681.50±302.02 ²⁾	2 454.78±458.86 ²⁾	2 260.23±169.71 ²⁾	1 188.70±196.49 ²⁾
乌梅散低剂量组	5.98	2 101.5±628.02	1 463.85±455.55	2 205.12±709.04	1 967.21±200.02 ³⁾	1 005.51±288.42
乌梅散高剂量组	11.96	1 801.2±373.65 ³⁾	1 282.19±315.49 ³⁾	1 883.52±392.54	1 754.21±148.50 ⁴⁾	872.30±194.92 ³⁾

组别	剂量/g·kg ⁻¹	抗肿瘤药耐药性	内分泌代谢病	免疫性疾病	寄生虫传染性疾病
正常组		109.35±12.35	99.76±11.87	33.26±5.36	17.32±5.16
模型组		199.05±31.05 ²⁾	165.87±29.61 ²⁾	49.68±6.87 ¹⁾	28.66±4.99 ¹⁾
乌梅散低剂量组	5.98	164.87±42.29	142.18±40.66	45.26±13.27	29.02±11.52
乌梅散高剂量组	11.96	141.44±26.14 ⁴⁾	129.89±27.26 ³⁾	36.74±6.93 ³⁾	26.21±8.37

4 讨论

肠道微生态是一个动态、稳定的系统,由肠道菌群与肠道系统共同构成,肠道菌群之间分泌物质互相制约或共生,与肠道黏膜环境形成生物屏障,并分泌大量的活性酶参与到机体食物的消化代谢中^[5,18]。正常的肠道菌群通过构建机械屏障、生物屏障和免疫屏障抵御外来病原微生物的入侵,维持肠道内环境的稳定和微生态平衡^[19]。伴随着抗生素的使用而发生的、无法用其他原因解释的菌群失调性腹泻又称为抗生素相关性腹泻(AAD),是抗生素最常见的不良反应之一^[20]。抗生素会减少肠道菌群多样性并破坏肠道细菌的功能,导致菌群紊乱促进致病微生物增生,从而造成腹泻^[21]。

乌梅散由乌梅肉、白茯苓、干木瓜、生姜组成,单味药“个性之专长”是组方“合群之妙用”的根本^[22]。研究表明,乌梅提取物及其制剂具有抗腹泻的作用,能够修复小肠黏膜,调控基因表达,调节肠道菌群结构等^[23-25];茯苓同样可以调节多种肠道菌群失调^[26-27],含茯苓的七味白术散还能有效提高腹泻小鼠乳糖酶的酶活性及基因多样性^[28-29];生姜及其制剂能够促进益生菌的增殖,调节肠道菌群结构,升高肠道短链脂肪酸含量,并对化疗相关腹泻、迟发性腹泻等多种腹泻起预防、治疗的作用^[30-32]。因此,乌梅散有望通过多种途径缓解腹泻症状,可能对乳糖酶活性、肠道菌群等微生态因素产生影响,从而发挥对失调肠道菌群的调节作用。

本研究表明,从宏观行为学来看,混合抗生素灌胃7 d导致了小鼠精神状态差、大便稀软、体质量减轻,猜测是抗生素影响了机体正常的消化吸收,造成菌群失调性腹泻,从而造成了体质量和摄食量的急剧下降。相较于自然恢复的模型组,低、高剂量的乌梅散均明显缓解了小鼠的腹泻,加快了体质量及摄食量的恢复速度,其中乌梅散高剂量组小鼠生长状况恢复最快,对小鼠的机体健康有明显积极影响。结合环境因子关联分析结果,体质量与腹泻率之间呈负相关,说明乌梅散给药组促进小鼠体质量快速恢复,可能是其缓解菌群失调性腹泻的机制之一。

人体肠道乳糖酶的主要来源于自身小肠黏膜分泌,肠道内的细菌、真菌能少量合成并分泌,还可以通过服用外源乳糖酶补充^[6],抗生素通过抑制乳糖酶产生菌而降低乳糖酶活性^[7]。研究发现,粪便中双歧杆菌的扩增与乳糖的代谢有关,是肠道产乳糖酶的关键菌群^[33],且双歧杆菌所产的乳糖酶活性明显高于其他肠道菌^[6]。本研究发现,相较于正常组,模型组的乳糖酶活性异常显著降低,乌梅散给药后乳糖酶活性显著提高,乌梅散高剂量组提高程度高于低剂量组;LefSe分析表明,双歧杆菌属在乌梅散高剂量组中富集;环境因子关联分析发现,乳糖酶活性与腹泻率间呈现负相关。说明,乌梅散促使双歧杆菌属丰度提高以产乳糖酶,提高乳糖酶活性,可能是其缓解菌群失调性腹泻的机制之一。

门水平分析结果表明,相较于正常组,模型组的拟杆菌门丰度显著降低,变形菌门、疣微菌门丰度明显升高,厚壁菌门和拟杆菌门的比值F/B值显著升高;乌梅散给药后不同程度上回调了拟杆菌门、变形菌门、疣微菌门丰度及F/B值。一般认为,拟杆菌门的丰度较高,厚壁菌门的丰度较低,变形菌门的丰度较低代表更为健康的肠道^[34]。变形菌门扩增是肠道生态失调的微生物特征,在胃肠道失衡疾病患者肠道多观察到变形菌门的扩张^[35]。厚壁菌门和拟杆菌门作为小鼠肠道菌群中的主要优势物种,二者的比值能在一定程度上反映菌群的紊乱程度^[34],抗生素相关性腹泻、肠易激综合征、肥胖等慢性疾病患者的肠道中F/B值增大^[36]。

在属水平上,与正常组比较,模型组小鼠 *norank f Muribaculaceae* 属、*norank f norank o Clostridia UCG-014* 属、*Lachnospiraceae NK4A136 group* 属、臭气杆菌属丰度明显降低,乌梅散高剂量组在不同程度上调了此4种菌属丰度;LefSe分析

发现,前3种菌属为正常组标志菌群;环境因子关联分析表明,此4种菌属与体质量、乳糖酶活性呈显著正相关,*norank f norank o Clostridia UCG-014* 属与腹泻率呈显著负相关。*norank f norank o Clostridia UCG-014* 属为已确定具有有益和有害影响^[37-38],在本研究中,其更有可能有益;*Lachnospiraceae NK4A136 group* 属为毛螺菌科NK4A136家族,毛螺菌科可产生短链脂肪酸,能改善肠道炎症,提高肠上皮屏障功能^[39],*Lachnospiraceae NK4A136 group* 属被认为是一种有益的肠道分类群^[38,40];臭气杆菌是促进代谢和免疫细胞保护免受结肠炎的关键成分,其丰度的减少与炎症性肠病、非酒精性脂肪性肝病等疾病有关,属于潜在益生菌^[41-42]。由此可见,乌梅散可增加肠道有益菌和正常菌丰度,可能是其缓解菌群失调性腹泻的机制之一。

在属水平上,与正常组比较,模型组阿克曼氏菌属、大肠埃希菌-志贺氏菌属、肠杆菌属、肠球菌属、无害梭菌属丰度明显升高,乌梅散低、高剂量组从不同程度下调了上述菌属的丰度;LefSe分析与环境因子关联分析表明,差异菌属中大肠埃希菌-志贺氏菌属、肠杆菌属、肠球菌属、无害梭菌属为模型组的标志菌群,且与体质量、乳糖酶活性呈负相关,与腹泻率呈正相关。阿克曼菌属能加剧鼠伤寒沙门菌诱发的肠道炎症,破坏宿主肠道黏膜的微生物平衡^[43],大肠埃希菌-志贺氏菌属、肠杆菌属、肠球菌属均是条件致病菌,在正常情况下能与共生菌达成生态平衡,但在肠道菌群紊乱时会大量生长及增殖,打破生态平衡而成为致病菌^[44-45];无害梭菌属是引起抗生素相关性腹泻的典型致病菌^[46]。可见,乌梅散能抑制肠道条件致病菌及典型腹泻相关菌属,可能是其缓解菌群失调性腹泻的机制之一。

PICRUSt功能预测发现,高剂量乌梅散能明显回调富集过高的新陈代谢、遗传信息处理、人类疾病等6个功能水平,对内分泌代谢病、免疫性疾病、寄生虫传染性等疾病等有积极影响,这一结果提示通过改善代谢途径、降低患病几率可能是乌梅散调节菌群失调性腹泻的机制之一。

乌梅散治小儿下痢后,津液减少,脏腑虚燥,烦渴引饮,及治诸病烦渴,引饮无度^[8],且方中君药乌梅有生津止泻之功效^[23],故乌梅散能通过补充津液,缓解腹泻所导致的津液减少等系列症状。中医学认为,津液是体内一切正常水液,包括各脏腑组织的内在体液和正常的分泌液,在胃肠中是以消化液形式存在,一方面保护胃肠黏膜,一方面保持胃

肠内正常菌群的生长,调节消化功能^[23,47-48],故津液发生变化定会影响肠道菌群。乌梅散能够改善肠道菌群结构,纠正菌群紊乱,可能是其生津止泻的机制之一。

综上所述,乌梅散提高乳糖酶活性、调节肠道菌群多样性与腹泻症状的缓解存在相关性,可以通过促进肠道微生态的恢复来发挥止泻作用。但机体肠道菌群的结构与组成相对复杂,仍有部分肠道菌及其生物学意义尚无法完全检测与诠释,后期将结合宏基因组测序技术从肠道菌群角度进一步验证与研究乌梅散的作用机制。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] ZENG M Y, INOHARA N, NUÑEZ G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut [J]. *Mucosal Immunol*, 2017, 10(1): 18-26.
- [2] 王威,王静. 基于网络药理学对七味白术散治疗菌群失调性腹泻的作用机制研究[J]. *世界中西医结合杂志*, 2021, 16(7): 1251-1255, 1264.
- [3] 孙少丹. 七味白术散治疗脾虚证泄泻幼鼠的肠道菌群-短链脂肪酸-黏液屏障相关研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2020.
- [4] ROWLAND I, GIBSON G, HEINKEN A, et al. Gut microbiota functions: Metabolism of nutrients and other food components[J]. *Eur J Nutr*, 2018, 57(1): 1-24.
- [5] 周康,肖嫩群,谭周进. 保和丸治疗食滞胃肠证泄泻的肠道微生态机制研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2022, 30(5): 217-222.
- [6] 谭周进,郭抗萧,曾奥,等. 肠道乳糖酶的研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2013, 21(28): 2897-2901.
- [7] 吴仪,谭周进. 腹泻与肠道乳糖酶活性的关系研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2021, 29(11): 571-576.
- [8] 太平惠民和剂局. 太平惠民和剂局方[M]. 刘景源,整理. 北京: 人民卫生出版社, 2017.
- [9] 谢志明. 乌梅丸治疗寒热错杂型慢性腹泻的临床观察[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2017.
- [10] 王继衡. 加味七味白术散治疗脾虚湿热型功能性腹泻的临床研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2020.
- [11] 覃雁. 黄贵华教授治疗腹泻型肠易激综合征的临床经验及用药规律研究[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2021.
- [12] 盛颖玥. 生姜泻心汤治疗寒热错杂型溃疡性结肠炎的临床观察及6-姜酚干预的作用机制研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2021.
- [13] 任娟. 肠道菌群失调后小鼠粪便酶活变化、人工干预

及其对免疫的影响[D]. 昆明: 云南大学, 2020.

- [14] 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) : 229-241.
- [15] REIKVAM D H, EROFEEV A, SANDVIK A, et al. Depletion of murine intestinal microbiota: Effects on gut mucosa and epithelial gene expression [J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e17996.
- [16] 郭宏伟,张妮妮,张伟,等. 抗生素诱导的菌群紊乱对幼鼠结肠黏膜屏障及免疫反应的影响[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2019, 34(7): 505-509.
- [17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 62-251.
- [18] TURNBAUGH P J, HENRISSAT B, GORDON J I. Viewing the human microbiome through three-dimensional glasses: Integrating structural and functional studies to better define the properties of myriad carbohydrate-active enzymes [J]. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2010, 66 (Pt 10): 1261-1264.
- [19] 刘瑞雪,李勇超,张波. 肠道菌群微生态平衡与人体健康的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(6): 383-387.
- [20] 韩天雨,杨栋,周树青,等. 抗生素所致肠道菌群失调与治疗研究进展[J]. *解放军预防医学杂志*, 2021, 39 (1): 98-101.
- [21] JINGJING S, YANSHU Z, YU L, et al. Factors related to antibiotic-associated diarrhea in patients in the intensive care unit receiving antifungals: A single-center retrospective study [J]. *J Int Med Res*, 2019, 47 (5): 2067-2076.
- [22] 段金廛. 中药资源化学: 理论基础与资源循环利用 [M]. 北京: 科学出版社, 2015: 151.
- [23] 管志伟. 加味人参乌梅汤调控腹泻大鼠肠道菌群结构和功能的宏基因组学研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2021.
- [24] 谢志明. 乌梅丸治疗寒热错杂型慢性腹泻的临床观察[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2017.
- [25] 王小婷,蒋国政,王海滨,等. 乌梅肉提取物抗腹泻作用研究[J]. *中国现代应用药学*, 2016, 33 (4) : 407-410.
- [26] 王琨,吴珊珊,黎攀,等. 茯苓对高尿酸血症大鼠肾损伤及肠道菌群的影响[J]. *食品科学*, 2022, 21: 171-179.
- [27] 张丹丹,叶晓川. 基于肠道菌群和代谢组学探讨茯苓水提取物健脾的作用机制[J]. *中华中医药杂志*, 2021,

- 36(7):3994-4001.
- [28] 龙承星. 七味白术散对菌群失调腹泻小鼠肠道黏膜细菌及乳糖酶基因多样性的影响[D]. 长沙:湖南中医药大学,2019.
- [29] 邓艳玲. 七味白术散对菌群失调腹泻小鼠肠道乳糖酶活性的影响[D]. 长沙:湖南中医药大学,2017.
- [30] 高宇. 基于肠道菌群探讨生姜泻心汤预防伊立替康迟发性腹泻的机制研究[D]. 北京:北京中医药大学,2021.
- [31] 高宇,孙建荣,邓超,等. 基于网络药理学及分子对接研究探索生姜泻心汤治疗化疗相关腹泻的作用机制[J]. 海南医学院学报,2021,13:1010-1020.
- [32] 陶俊,寇硕,唐小云. 生姜对小鼠肠道菌群及局部免疫功能的调节作用[J]. 牡丹江医学院学报,2019,40(5):15-17.
- [33] SZILAGYI A. Adaptation to lactose in lactase non persistent people: Effects on intolerance and the relationship between dairy food consumption and evaluation of diseases[J]. *Nutrients*, 2015, 7(8): 6751-6779.
- [34] 刘甜. 肠道菌群—筛查肺癌患者免疫相关性腹泻的新标志物[D]. 北京:中国人民解放军医学院,2018.
- [35] LITVAK Y, BYNDLOSS M X, TSOLIS R M, et al. Dysbiotic Proteobacteria expansion: A microbial signature of epithelial dysfunction[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2017, 39:1-6.
- [36] SHAO H, ZHANG C, XIAO N, et al. Gut microbiota characteristics in mice with antibiotic-associated diarrhea[J]. *BMC Microbiol*, 2020, 20(1):313.
- [37] SAMUL D, WORSZTYNOWICZ P, LEJA K, et al. Beneficial and harmful roles of bacteria from the *Clostridium* genus[J]. *Acta Biochim Pol*, 2013, 60(4): 515-521.
- [38] ZHA H, SI G, WANG C, et al. Multiple intestinal bacteria associated with the better protective effect of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* LI09 against rat liver injury[J]. *Biomed Res Int*, 2022, 2022:8647483.
- [39] 尚玲,李琪,杨栋,等. 心境稳定剂影响双相情感障碍躁狂发作患者肠道菌群变化[J]. 神经损伤与功能重建,2022,17(5):259-263.
- [40] CHEN H L, XING X, ZHANG B, et al. Higher mucosal type II immunity is associated with increased gut microbiota diversity in BALB/c mice after *Trichinella spiralis* infection[J]. *Mol Immunol*, 2021, 138:87-98.
- [41] 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.
- [42] LIMA S F, GOGOKHIA L, VILADOMIU M, et al. Transferable immunoglobulin a-coated *Odoribacter splanchnicus* in responders to fecal microbiota transplantation for ulcerative colitis limits colonic inflammation [J]. *Gastroenterology*, 2022, 162(1): 166-178.
- [43] 易南星,米倚林,许晓彤,等. 加味独活寄生合剂缓解小鼠膝关节炎过程中肠道菌群的参与机制[J]. 中国药理学通报,2022,38(4):625-632.
- [44] 王鹏飞. 志贺菌、大肠埃希菌和沙门菌CRISPR结构特征生物信息学分析[D]. 郑州:郑州大学,2015.
- [45] 张银娇,贾金荣,龙小慧,等. 穴位贴敷治疗对急性腹泻小儿肠道菌群的影响[J]. 中国中西医结合儿科学,2020,12(3):239-242.
- [46] 詹扬,万建华,李颖萌,等. 乳酸菌素片对抗生素相关性腹泻小鼠肠道菌群的影响[J]. 中国乳品工业, 2021,49(8):4-9,36.
- [47] 刘宝华,苏新民,马芝艳. 津液与水通道蛋白[J]. 江西中医药,2005,36(11):14-15.
- [48] 蒋美琼,杨义. 人体消化液的成分及作用[J]. 中学生物学,2008,24(1):4-5.

[责任编辑 周冰冰]