

参苓白术散对体外艰难梭菌生长的影响

舒青龙*, 徐刚, 叶荷平, 章喜林, 封勇, 魏娜
(江西中医学院基础医学院, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 探讨参苓白术散对抗生素相关性腹泻(AAD)主要致病菌艰难梭菌的体外抑菌作用。方法: 按正常培养组(脑心浸液培养基培养)和加药培养组(脑心浸液培养基中加入不同稀释梯度的参苓白术散水煎剂, 加药体积分别为体积比为: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}), 应用连续采样和分光光度法, 测定 4 株艰难梭菌(NC-1, NC-2, SH182, 和 SH186, 其中 2 株为 A^+B^+ , 2 株为 A^-B^+)的体外生长曲线。结果: 加药(参苓白术散水煎剂)体积比为: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 的培养基对艰难梭菌 NC-1, 以及加药体各为 10^{-1} 的参苓白术散水煎剂对艰难梭菌 NC-2 有明显的抑制作用($P < 0.05$), 不同稀释度的加药培养基对 4 种不同的艰难梭菌均有一定的影响, 艰难梭菌最大生长细菌菌落均有一定程度的减少。结论: 参苓白术散对 AAD 病主要致病菌艰难梭菌在体外具有一定的抑制作用。

[关键词] 艰难梭菌; 参苓白术散; 抗生素相关性腹泻; 抑菌作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0258-05

Influences of Shenglin Baizhu Powder on *in vitro* Growth of *Clostridium difficile*

SHU Qing-long*, XU Gang, YE He-ping, ZHANG Xi-lin, FENG Yong, WEI Na
(School of Basic Medicine Sciences, Jiangxi University of Traditional
Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[收稿日期] 20120616(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81001680); 江西省自然科学基金项目(20122BAB205073)

[通讯作者] *舒青龙, 博士, 副教授, 从事中药微生态工作, Tel: 791-87118921, E-mail: shuqinglong@yahoo.com.cn

[参考文献]

- [1] Liu Jicheng, Sun Yongxu, Liu Lei, et al. A water-soluble polysaccharide (EFP-AW1) from the alkaline extract of the roots of a traditional Chinese medicine, *Euphorbia fischeriana*: Fraction and Characterization [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87(3): 1299.
- [2] 林宇, 崔红霞, 许惠玉, 等. 岩大戟内酯 B 对人乳腺癌 Bcap37 细胞凋亡的影响 [J]. *中国新药杂志*, 2012, 21(7): 780.
- [3] 刘东岳, 刘安军. T 细胞死亡途径及其相关的肿瘤免疫逃避 [J]. *肿瘤防治研究*, 2011, 38(8): 963.
- [4] 雷萍, 关洪全, 王昊. 不同产地人参水煎剂对免疫抑制小鼠细胞免疫功能的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(8): 218.
- [5] Michal Baniyash. Chronic inflammation, immunosuppression and cancer: New insights and outlook [J]. *Semin in Cancer Biol*, 2006, 16(7): 80.
- [6] 李世刚, 陈燕. 资本瓜多糖对小鼠佐剂性关节炎的作用及其机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(12): 159.
- [7] 崔维, 吴国学, 张振凌. 牛膝饮片及牛膝多糖对小鼠免疫抑制调节作用的研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(16): 141.
- [8] 樊俊杰, 贾正平, 谢景文, 等. 狼毒多糖对环磷酰胺处理小鼠免疫功能的影响 [J]. *西北国防医学杂志*, 2000, 21(4): 263.
- [9] 孙志忠, 黎勇, 赫文辉, 等. 瑞香狼毒与大戟狼毒糖类成份的比较研究 [J]. *黑龙江大学自然科学学报*, 1996, 13(4): 88.
- [10] 孙志伟, 王延宝, 白新伟. 瑞香狼毒多糖中单糖组成的毛细管区带电泳分析 [J]. *分析试验室*, 2010, 29(6): 7.
- [11] Gaelic L. Flarell R A. Abrogation of TGF- β_1 signaling in T cells leads to spontaneous T cells differentiation and autoimmune disease [J]. *Immunity*, 2000, 12(2): 171.

[责任编辑 李玉洁]

[Abstract] Objective: To investigate the *in vitro* bacteriostatic action of Shenglin Baizhu powder (SBP) on *Clostridium difficile*, a major pathogen of antibiotic associated diarrhea (AAD). **Method:** The normal culture group (cultured on brain heart infusion) and cultured on adding medicine culture group (cultured on brain heart infusion adding a series dilution of with V/V: 1×10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , and 10^{-4}) were used to test the influences of SBP on *in vitro* growths of four clinic *C. difficile* isolates (NC-1, NC-2, SH182 and SH186) including two A⁺B⁺ stains and two A⁻B⁺ stains respectively, using continual exampling and spectrophotometry methods. **Result:** The modified brain heart infusion medium adding SBP decoction of whole dilution (V/V: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} and 10^{-4}) and of the 10^{-1} dilution significantly inhibited the growths of *C. difficile* NC-1 and *C. difficile* NC-2 respectively ($P < 0.05$), while modified BHI medium adding other series dilution SBP decoctions exhibited slight influences on all selective *C. difficile* strains by decreasing the bacterial CFU · mL⁻¹ (colony forming units per milliliter) maximum. **Conclusion:** SBP has some bacteriostatic action to influence the growth of AAD pathogens.

[Key words] *Clostridium difficile*; Shengli Baizhu powder; antibiotic associated diarrhea; bacteriostatic action

抗生素相关性腹泻病(AAD)是一种全球性的疾病,许多国家均有发生^[1-2]。AAD发生首先是抗生素(如头孢霉素、广谱青霉素、喹诺酮类及氨基糖苷抗生素类等)的滥用,导致肠内菌群的自然生态平衡失调,随后致病菌如艰难梭菌的侵入或定值而引起AAD病^[3-4]。

对于AAD病的治疗,西药临床最常用的是甲硝唑和万古霉素2种抗生素。然而,这种治疗的理念常常被专业人士所质疑,原因是AAD病本来就是由抗生素所引起的疾病,再用抗生素去治疗,将会陷入“抗生素治疗抗生素病”的怪圈。中医药讲究的整体观和扶正祛邪的治疗理念比西药更具合理性^[5]。临床上,中药复方对AAD病的治疗具较好的疗效,如参苓白术散等^[6]。

对于AAD病,艰难梭菌是一种主要的致病菌,该菌为厌氧、革兰阳性及产孢子的1种杆菌^[2]。早在20世纪70年代的报道中就提到,2种毒素分别为毒素A和毒素B,参与艰难梭菌相关性疾病的致病过程。例如,根据其毒素基因的存在,分为2类,艰难梭菌模型菌株M68和CF5属于A⁻B⁺型,而模型菌株R20291, M120和630属于A⁺B⁺型^[7]。参苓白术散出自宋代的《太平惠民合剂局方》,由人参、茯苓、白术、山药、白扁豆、莲子、薏苡仁、砂仁、桔梗、甘草等组成,是应用很广的一个经典名方,并且该方在临床上对AAD病的治疗具较好的疗效^[5-6]。因此,从体内和体外的角度研究参苓白术散对致病菌艰难梭菌的影响显得非常的必要。

本研究旨在观察参苓白术散水煎剂系列稀释梯度对4种艰难梭菌临床分离株的体外生长的影响。

1 材料

1.1 药物 参苓白术散(人参10 g,茯苓10 g,白术10 g,山药10 g,甘草10 g,白扁豆7.5 g,莲子5 g,薏苡仁5 g,砂仁5 g,桔梗5 g),购自江西中医学院附属医院。

1.2 菌株 艰难梭菌菌株SH182(A⁻B⁺)和SH182(A⁺B⁺),由复旦大学赠送,艰难梭菌菌株NC-1(A⁻B⁺)和NC-2(A⁺B⁺)由中国疾病预防控制中心赠送。

1.3 试剂 DNA提取试剂盒提取,日本TaKaRa公司,批号D824A;LA Taq DNA聚合酶,日本TaKaRa公司,批号DRR002A;实验用引物厌氧菌培养基BHI,Oxoid公司,批号CM1136,CM1135;艰难梭菌选择性培养基,Oxoid公司,批号CM0106;环丝氨酸(D-cycloserine)和头孢西丁(Cefoxitin),Oxoid公司,批号SR0096;去纤维蛋白马血(defibrinated horse blood)[7%],Oxoid公司,批号SR0050;厌氧产气袋,Oxoid公司,批号AN0020;厌氧指示剂刃天青,Oxoid公司,批号BR0055。

1.4 仪器 BIOER Life Express-PCR仪(杭州博日科技有限公司);752-紫外分光光度分析仪(上海棱光技术有限公司);SW-CJ-2D-净化操作台(苏州净化设备有限公司);H-1650-高速离心机(湖南湘仪食品有限公司);2.5 L-厌氧培养罐(Oxoid公司);YQX-II-系列厌氧培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司);SPX-150B-Z-生化培养箱(上海光都仪器设备有限公司)。

2 方法

2.1 煎液及加药脑心浸液培养基的准备 参苓白术散文火煎20 min,然后制备成200 mL的水煎液。

所有的水煎液经 0.2 μm 多聚碳酸纤维膜过滤(用 0.45 μm 膜支持)除菌,放入 -20 °C 备用。按系列稀释梯度将水煎液加入脑心浸液培养基中,至加药的终浓度(体积比)分别为 1 × 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴。

2.2 艰难梭菌菌株及厌氧培养 所有菌株先由艰难梭菌选择性培养基[脑心浸液加 *D*-cycloserine (250 mg·L⁻¹), Cefoxitin (8 mg·L⁻¹) 和 defibrinated horse blood (7%)]活化复壮,然后接种约 10³ 细胞至正常脑心浸液培养基和加药脑心浸液培养基中,用 Oxoid 厌氧培养罐加入厌氧产气袋分别进行厌氧培养,以刃天青作为厌氧指示剂。

2.3 菌株的鉴定 所有纯培养的菌株 DNA 根据试剂盒操作说明进行 DNA 提取。样中的 16S rRNA 基因利用通用引物 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACT-3') 进行扩增,扩增的体系如下:总体积为 50 μL,含 10 nmol dNTP, 15 nmol·L⁻¹ 含 Mg²⁺ 的 PCR 缓冲液,每条引物 15 pmol·L⁻¹, 100 ng DNA 模板和 5 U 的 LA *Taq* DNA 聚合酶。扩增得到的 16 S rRNA 基因序列到 NCBI 数据库上进行 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 比对以确定其菌株的分类。同时,毒素基因包括 TcdA 和 TcdB 基因按以前文献描述的方法进行扩增和分析^[8-9]。

2.4 取样和 CFU 检测 所有菌株样品分别在正常脑心浸液培养基及加药脑心浸液培养基中进行培

养,分别在厌氧培养的第 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 进行取样。获得的菌液在 10 000 r·min⁻¹ 下离心 15 min 进行收集,然后用无菌 PBS 液洗 2 次,制成菌液悬液,再用分光光度计在波长为 600 nm 处进行 A 值的测定。

2.5 数据分析 采用 SPSS 12.0 统计软件分析数据,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用方差分析,正常培养组与加药培养组(包括不同体积的加药组)两两比较用 *T* 检验, *P* < 0.05 为差异有显著性。

3 结果

3.1 菌株鉴定 艰难梭菌菌株 SH182, SH186, NC-1 和 NC-2 的 16 S rRNA 基因扩增后并测序,序列经 NCBI 上进行比对,结果显示其分别和艰难梭菌的模式菌株 *Clostridium difficile* BI1 的 16 S rRNA 基因的序列相似性为 99%, 99%, 98%, 96%, 证实所用菌株均为艰难梭菌。同时,按文献方法对所有菌株的毒素基因进行检测^[8-9],结果与菌株毒素的型号均一致。

3.2 对菌株 NC-1 体外生长的影响 对于毒素型 A⁻B⁺ 菌株 NC-1,对照正常脑心浸液培养基和加药脑心浸液培养基的生长情况,正常脑心浸液培养基的最大值为 (4.331 ± 0.201) × 10⁸ CFU·mL⁻¹,而加药脑心浸液培养基的最大值为 (0.565 ± 0.014 ~ 0.723 ± 0.021) × 10⁸ CFU·mL⁻¹,呈现明显的下降。正常和加药培养基艰难梭菌 NC-1 的生长呈现显著的差别 (*P* < 0.05),但对于不同稀释梯度的加药培养基,则没有统计学上的差别(表 1)。

表 1 参苓白术散对菌株 NC-1 (A⁻B⁺) 体外生长的影响

时间/h	不同稀释度的加药(参苓白术散煎剂)/CFU·mL ⁻¹ × 10 ⁸				正常培养
	10% 煎剂	1% 煎剂	0.1% 煎剂	0.01% 煎剂	对照(不加药)
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
4	0.213 ± 0.012	0.296 ± 0.011	0.224 ± 0.011	0.213 ± 0.011	0.216 ± 0.012
8	0.269 ± 0.013	0.195 ± 0.021	0.285 ± 0.012	0.333 ± 0.011	1.555 ± 0.113
12	0.272 ± 0.021	0.307 ± 0.021	0.365 ± 0.021	0.352 ± 0.013	1.979 ± 0.181
16	0.477 ± 0.021	0.419 ± 0.019	0.472 ± 0.021	0.533 ± 0.014	3.963 ± 0.147
20	0.723 ± 0.021	0.573 ± 0.017	0.568 ± 0.024	0.565 ± 0.014	4.331 ± 0.201
24	0.219 ± 0.013	0.179 ± 0.012	0.221 ± 0.012	0.224 ± 0.011	3.456 ± 0.186

3.3 对菌株 NC-2 体外生长的影响 对于毒素型 A⁺B⁺ 菌株 NC-2,对照正常脑心浸液培养基和加药脑心浸液培养基的生长情况,正常脑心浸液培养基的最大值为 (5.408 ± 0.472) × 10⁸ CFU·mL⁻¹,而加药脑心浸液培养基的最大值为 (0.184 ± 0.017 ~

4.896 ± 0.312) × 10⁸ CFU·mL⁻¹,总体呈现轻微的下降。正常和 10% 加药培养基对艰难梭菌 NC-2 的生长呈现显著的差别 (*P* < 0.05),但对于其他不同稀释梯度(10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴) 的加药培养基,则没有统计学上的差别(表 2)。

表2 参苓白术散对菌株 NC-2 (A⁺B⁺) 体外生长的影响 ($\bar{x} \pm s$) $\times 10^8$ CFU·mL⁻¹

时间 /h	不同稀释度的加药(参苓白术散煎剂)				正常培养
	10% 煎剂	1% 煎剂	0.1% 煎剂	0.01% 煎剂	对照(不加药)
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
4	0.056 ± 0.008	0.096 ± 0.010	0.121 ± 0.012	0.092 ± 0.010	0.192 ± 0.022
8	0.084 ± 0.006	0.262 ± 0.012	0.342 ± 0.017	0.184 ± 0.017	0.468 ± 0.035
12	0.176 ± 0.009	1.920 ± 0.118	2.152 ± 0.112	0.556 ± 0.032	2.084 ± 0.161
16	0.128 ± 0.011	2.624 ± 0.203	4.896 ± 0.312	1.876 ± 0.111	5.408 ± 0.472
20	0.172 ± 0.016	4.448 ± 0.327	4.184 ± 0.342	4.364 ± 0.386	4.936 ± 0.463
24	0.184 ± 0.018	3.316 ± 0.311	3.536 ± 0.292	3.468 ± 0.316	3.632 ± 0.457

3.4 对菌株 SH182 体外生长的影响 对于毒素型 A⁻B⁺ 菌株 SH182, 对照正常脑心浸液培养基和加药脑心浸液培养基的生长情况, 正常脑心浸液培养基的最大值为 $(10.368 \pm 0.794) \times 10^8$ CFU·mL⁻¹, 而加药脑心浸液培养基的最大值为 $(7.456 \pm 0.438 \sim 8.600 \pm 0.366) \times 10^8$ CFU·mL⁻¹, 总体呈现不明显地下降, 正常培养基和加药培养基及不同稀释梯度 ($10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$) 的加药培养基之间, 艰难梭菌 SH182 的生长无显著的差别(表3)。

3.5 对菌株 SH186 体外生长的影响 对于毒素型 A⁺B⁺ 菌株 SH186, 对照正常脑心浸液培养基和加

药脑心浸液培养基的生长情况, 正常脑心浸液培养基的最大值为 $(10.368 \pm 0.578) \times 10^8$ CFU·mL⁻¹, 而加药脑心浸液培养基的最大值为 $(7.176 \pm 0.511 \sim 8.600 \pm 0.611) \times 10^8$ CFU·mL⁻¹, 与 SH182 生长情况类似, 总体呈现不明显地下降, *T* 检验显示正常培养基和加药培养基, 及不同稀释梯度 ($10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$) 的加药培养基之间, 艰难梭菌 SH186 的生长无显著的差别(表4)。

4 讨论

以中医药的观点, AAD 是一种“脾失健运”病, 其内因是肠道菌群平衡的失调, 其外因是艰难梭菌

表3 参苓白术散对菌株 SH182 (A⁻B⁺) 体外生长的影响 ($\bar{x} \pm s$) $\times 10^8$ CFU·mL⁻¹

时间 /h	不同稀释度的加药(参苓白术散煎剂)				正常培养
	10% 煎剂	1% 煎剂	0.1% 煎剂	0.01% 煎剂	对照(不加药)
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
4	1.920 ± 0.173	2.000 ± 0.167	2.080 ± 0.201	2.000 ± 0.182	2.560 ± 0.213
8	3.200 ± 0.291 ¹⁾	2.800 ± 0.182 ¹⁾	3.360 ± 0.200 ¹⁾	2.880 ± 0.193 ¹⁾	4.240 ± 0.315
12	6.016 ± 0.371 ¹⁾	4.632 ± 0.361 ¹⁾	5.208 ± 0.264 ¹⁾	4.976 ± 0.322 ¹⁾	7.560 ± 0.523
16	7.312 ± 0.515 ¹⁾	7.448 ± 0.373 ¹⁾	6.888 ± 0.321 ¹⁾	7.424 ± 0.560 ¹⁾	9.272 ± 0.561
20	7.496 ± 0.521 ¹⁾	8.600 ± 0.366 ¹⁾	7.712 ± 0.373 ¹⁾	7.456 ± 0.438 ¹⁾	10.368 ± 0.794
24	6.960 ± 0.471 ¹⁾	7.600 ± 0.489 ¹⁾	7.632 ± 0.431 ¹⁾	7.296 ± 0.491 ¹⁾	10.320 ± 0.566

表4 参苓白术散对菌株 SH186 (A⁺B⁺) 体外生长的影响 ($\bar{x} \pm s$) $\times 10^8$ CFU·mL⁻¹

时间 /h	不同稀释度的加药(参苓白术散煎剂)				正常培养
	10% 煎剂	1% 煎剂	0.1% 煎剂	0.01% 煎剂	对照(不加药)
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
4	2.632 ± 0.213	1.263 ± 0.110	1.112 ± 0.150	0.987 ± 0.101	2.432 ± 0.185
8	4.632 ± 0.376 ¹⁾	3.536 ± 0.179	2.536 ± 0.179	2.896 ± 0.192	7.024 ± 0.523
12	6.608 ± 0.573 ¹⁾	5.208 ± 0.403	4.976 ± 0.281	4.496 ± 0.317	7.744 ± 0.496
16	7.448 ± 0.629 ¹⁾	6.888 ± 0.422	7.456 ± 0.526	7.632 ± 0.492	9.272 ± 0.677
20	8.600 ± 0.611 ¹⁾	7.712 ± 0.571	7.424 ± 0.478	7.176 ± 0.511	10.368 ± 0.578
24	5.696 ± 0.477 ¹⁾	5.576 ± 0.435	6.264 ± 0.444	5.688 ± 0.473	7.560 ± 0.519

的侵入或定值^[5, 10-11]。中医药讲究根据不同的证候进行辨证施治,强调治疗中的整体观和扶正祛邪理念,这完全不同于西医上过度的偏重于抗生素杀灭致病菌。参苓白术散已经应用于 AAD 的治疗数 10 年,应用广泛且疗效明显^[5-6],因为该中药复方具有多种中医学上的主治功效,如健脾、益气、祛痰、渗湿等,符合 AAD 的中医药治则思想^[12]。

一些文献已经报道参苓白术散扶正方面的研究,如可以明显地促进人体益生菌如乳酸菌和双歧杆菌的增长等^[13]。但是,对于参苓白术散祛邪方面的研究却鲜见报道。因此,研究参苓白术散对 AAD 致病菌体外生长的影响,是参苓白术散药理研究一个有价值的研究点。

本研究中,我们通过测定参苓白术散系列梯度稀释(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4})的加药脑心浸液培养基对 4 株艰难梭菌的临床分离株(NC-1, NC-2, SH182, 和 SH186, 毒素类型上, 2 株为 A^+B^+ , 2 株为 A^-B^+), 结果显示, 所有系列稀释梯度(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4})的参苓白术散水煎剂对艰难梭菌 NC-1, 以及稀释梯度为 10^{-1} 的参苓白术散水煎剂对艰难梭菌 NC-2 有明显的抑制作用($P < 0.05$), 同时, 其他所有加药的不同稀释的培养基对 4 种不同的艰难梭菌最大生长值均有一定的影响, 提示参苓白术散可能在人体内有一定程度的直接抑菌作用。

[致谢] 黄海辉博士和程颖博士提供本实验用的艰难梭菌。

[参考文献]

[1] Fitzpatrick F, Oza A, Gilleece A, et al. Laboratory diagnosis of clostridium difficile associated disease in the republic of ireland; A survey of irish microbiology laboratories [J]. J Hosp Infect, 2008, 68(4): 315.
[2] Huang H H, Wu S, Wang M G, et al. Molecular and

clinical characteristics of clostridium difficile infection in a university hospital in shanghai, china [J]. Clin Infect Dis, 2008, 47(12): 1606.

[3] 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.
[4] Surawicz C M. The microbiota and infectious diarrhea [J]. Gastroenterologie Clinique Et Biologique, 2010, 34(3): 29.
[5] 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.
[6] 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.
[7] Cheng Y, Du P C, Chen C, et al. Toxin a-negative, toxin b-positive clostridium difficile infection diagnosed by polymerase chain reaction [J]. Infect Cont Hospi Epide, 2011, 32(5): 520.
[8] Kato H, Kato N, Watanabe K, et al. Identification of toxin a-negative, toxin b-positive clostridium difficile by pcr [J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(8): 2178.
[9] Stubbs S, Rupnik M, Gibert M, et al. Production of actin-specific adp-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of clostridium difficile [J]. FEMS Microbiol Lett, 2000, 186(2): 307.
[10] 李庆生, 袁嘉丽, 陈文慧. 中医学“正气”应包括微生态与免疫平衡 [J]. 云南中医学院学报, 2005, 28(1): 1.
[11] 王占国. 中医“脾”与消化道正常菌群. 中国微生态学杂志 [J]. 1991, 3(2): 65.
[12] 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.
[13] 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.

[责任编辑 李玉洁]