

· 经典名方 ·

四君子汤及其单味药水煎液对脾虚大鼠肠道菌群的调节作用

黄文武, 彭颖, 王梦月, 彭崇胜, 李晓波*
(上海交通大学药学院, 上海 200240)

[摘要] **目的:**探讨四君子汤及其单味药(人参、白术、茯苓、炙甘草)水煎液对脾虚大鼠肠道菌群的调节作用。**方法:**正常大鼠随机分为空白组、模型组、整肠生颗粒组、四君子汤组及各单味药组,连续 10 d 灌胃给予番泻叶水煎液塑造脾虚模型(空白组给予蒸馏水),再连续 7 d 分别给予相应药物治疗(空白组、模型组给予蒸馏水)。收集造模前(第 0 天),造模结束(第 11 天)和治疗结束(第 18 天)的粪便样品,经硫酸酸化、乙醚萃取处理后采用气相色谱法分析样品中短链脂肪酸含量的变化,利用 16S rDNA-聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术分析粪便样品中肠道菌群结构的变化。**结果:**造模结束时,与空白组比较,各给药组大鼠粪便短链脂肪酸含量、肠道菌群多样性指数和相似性系数均显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),表明脾虚模型造模成功。治疗结束时,与模型组比较,白术组大鼠粪便短链脂肪酸含量、肠道菌群多样性指数和相似性系数均极显著升高($P < 0.01$),四君子汤组、人参组和茯苓组部分指标极显著升高、部分指标显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);而炙甘草组仅多样性指数有所升高($P < 0.05$),粪便短链脂肪酸含量和相似性系数则均无显著性差异。**结论:**四君子汤对脾虚大鼠肠道菌群的恢复调节时,白术可能发挥主要作用,人参、茯苓也发挥了一定作用。

[关键词] 四君子汤; 脾虚证; 肠道菌群; 短链脂肪酸; 多样性指数; 相似性指数; 聚合酶链式反应

[中图分类号] R22;R24;R28;R94;C37 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)11-0008-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190847

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190101.1122.011.html>

[网络出版时间] 2019-01-04 9:29

Regulatory Effect of Sijunzi Tang and Its Single Herbs on Intestinal Flora in Rats with Spleen Deficiency

HUANG Wen-wu, PENG Ying, WANG Meng-yue, PENG Chong-sheng, LI Xiao-bo*
(School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the regulatory effect of Sijunzi Tang (SJZT) and its single herbs (Ginseng Radix et Rhizoma, Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata cum Melle, Atractylodis Macrocephalae Rhizoma and Poria) on intestinal flora in spleen-deficient rats. **Method:** Normal rats were randomly divided into the blank group, model group, Zhengchangsheng granules group, SJZT group and each single herb group, rats were orally administered Sennae Folium decoction to induce diarrhea for ten consecutive days to establish a spleen-deficient model (distilled water for the blank group), then treated with the corresponding drugs for seven consecutive days (distilled water for the blank group and the model group). Fresh feces were collected on pre-modeling (0th day), post-modeling (11th day), and post-treatment (18th day). Short-chain fatty acids (SCFAs) in feces were acidified by sulphuric acid and extracted by diethyl ether, then determined by gas chromatography. The structural change (diversity and similarity) of intestinal flora in feces was analyzed by 16S rDNA-polymerase chain reaction (PCR) -denaturing gel gradient electrophoresis (DGGE) technique. **Result:** Compared with

[收稿日期] 20180911(019)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973962/H2903)

[第一作者] 黄文武,博士,高级工程师,从事药品开发及质量标准研究,Tel:021-34204805,E-mail:wenwuh@126.com

[通信作者] * 李晓波,博士,教授,从事天然药物活性成分与质量标准、中药品质及基因资源保护研究,Tel:021-34204804,E-mail:xbli@sju.edu.cn

(PVP), 十二烷基硫酸钠(SDS), 三羟甲基氨基甲烷(Tris)-饱和酚均购自上海思吉生物制品有限公司; 丙酸、丁酸、异丁酸(批号分别为 20120903, 20120818, 20120912), Tris 和乙二胺四乙酸二钠(EDTA·Na₂)均购自国药集团化学试剂有限公司; 乙酸(上海凌峰化学试剂有限公司, 批号 20120728), 异戊酸(西格玛奥德里奇中国公司, 批号 MKBJ8734V), 戊酸、己酸和 2-甲基戊酸(百灵威科技有限公司, 批号分别为 LL90L07, L470L05, LV80L19), Taq 反应缓冲液和 Taq DNA 聚合酶(上海莱枫生物科技有限公司), 琼脂糖(上海捷倍思基因技术有限公司), 尿素、去离子甲酰胺(北京博大泰克生物基因技术有限公司), 变性梯度凝胶电泳(DGGE)标记物 II(上海西宝生物科技有限公司); 裂解液 I(150 mmol·L⁻¹ NaCl, 100 mmol·L⁻¹ EDTA·Na₂, pH 8.0), 裂解液 II(100 mmol·L⁻¹ NaCl, 500 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0), 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4, 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸钠缓冲液, 1 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄ 77.4 mL, 1 mol·L⁻¹ NaH₂PO₄ 22.6 mL), Tris-乙酸(TAE), Tris-硼酸(TBE)等溶液的配制参照《分子克隆实验指南》自制^[16]。番泻叶、人参、白术、茯苓饮片均购自上海华宇药业有限公司; 生甘草饮片购自内蒙古亿利科技实业股份有限公司, 按 2015 年版《中国药典》收载的方法炮制成炙甘草; 上述饮片均经上海交通大学药学院王梦月副教授鉴定, 符合 2015 年版《中国药典》(一部)的有关规定。地衣芽孢杆菌活菌颗粒(整肠生颗粒, 东北制药集团沈阳第一制药有限公司, 批号 S20120022, 规格 0.5 g/包), 水为蒸馏水。

番泻叶水煎液(取番泻叶饮片约 5 kg, 加 10 倍量水浸泡 2 h, 加热煎煮 3 次, 每次 40 min, 过滤, 合并 3 次滤液, 水浴加热浓缩至生药质量浓度 1 g·mL⁻¹, 4 °C 保存备用), 四君子汤水煎液[人参、白术、茯苓、炙甘草饮片按质量比 9:9:9:6 配方, 煎煮方法同番泻叶水煎液, 水浴加热浓缩至生药质量浓度 0.3 g·mL⁻¹(临床等效剂量), 4 °C 保存备用], 人参、白术、茯苓水煎液[分别取人参、白术、茯苓饮片, 煎煮方法同番泻叶水煎液, 分别水浴加热浓缩至生药质量浓度 0.082 g·mL⁻¹(按处方量计算为四君子汤的 9/33), 4 °C 保存备用], 炙甘草水煎液[取炙甘草饮片, 煎煮方法同番泻叶水煎液, 水浴加热浓缩至生药质量浓度 0.054 g·mL⁻¹(按处方量计算为四君子汤的 6/33), 4 °C 保存备用]和整肠生颗粒溶液[取整肠生颗粒, 用温水冲泡至 13.5 g·L⁻¹(临床等

效剂量), 新鲜配制使用]均为实验室自制。

Wistar 雄性大鼠 48 只, 体质量(190 ± 20) g, 由上海斯莱克实验动物有限公司提供, 合格证号 SCXK(沪) 2007-0005。分笼饲养于室温(24 ± 2) °C, 12 h 昼夜交替的上海交通大学药学院 SPF 级实验动物房中, 自由饮水和进食。本文涉及的动物实验经上海交通大学实验动物福利与伦理委员会批准。

2 方法与结果

2.1 动物分组及造模 Wistar 雄性大鼠 48 只, 随机分为 8 组, 分别为空白组、模型组、整肠生颗粒组、四君子汤组、人参组、白术组、茯苓组和炙甘草组, 每组 6 只。空白组每天按剂量 10 mL·kg⁻¹ 给予蒸馏水, 其余各组每天按剂量 10 g·kg⁻¹ 给予番泻叶水煎液, 每天 2 次, 连续 10 d, 制备脾虚模型。

2.2 给药治疗 造模成功后, 从第 11 天开始, 空白组和模型组灌胃给予蒸馏水; 整肠生颗粒组给予整肠生颗粒溶液(0.135 g·kg⁻¹); 四君子汤组给予四君子汤水煎液(3 g·kg⁻¹); 人参组给予人参水煎液(0.82 g·kg⁻¹); 白术组给予白术水煎液(0.82 g·kg⁻¹); 茯苓组给予茯苓水煎液(0.82 g·kg⁻¹); 炙甘草组给予炙甘草水煎液(0.54 g·kg⁻¹)。每天 1 次, 连续 7 d。

2.3 粪便样品采集 分别在造模前(第 0 天), 造模结束(第 11 天)和治疗结束(第 18 天)采集大鼠新鲜粪便, 置于无菌离心管中, 样品采集后立即在 -20 °C 冷冻保存备用。

2.4 短链脂肪酸含量变化的分析

2.4.1 气相色谱条件 Agilent 19095F-123 HP-FFAP 毛细管柱(0.53 mm × 30 m, 1.00 μm), 程序升温(初始温度 100 °C, 保持 1 min, 以 5 °C·min⁻¹ 的速率升至 200 °C, 保持 2 min), 分流比 5:1, 载气为高纯氮气(纯度 ≥ 99.999%), 载气流速 3.0 mL·min⁻¹, 氢气流速 30 mL·min⁻¹, 空气流速 400 mL·min⁻¹, 进样口温度 270 °C, 检测器温度 280 °C, 进样量 1.0 μL。

2.4.2 分析样品的制备 精密称取乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸和己酸适量, 加乙醚制成质量浓度分别约 0.5 g·L⁻¹ 的混合溶液, 作为对照品贮备液。精密称取 2-甲基戊酸适量, 加乙醚制成质量浓度约 0.2 g·L⁻¹ 的内标溶液。取粪便样品 2.0 g, 加水 10 mL 涡旋搅碎混匀, 于 5 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 取上清 2.0 mL, 加入 50% H₂SO₄ 0.2 mL, 加入稀释的内标溶液(取内标溶液 50 mL, 加乙醚稀释

至 100 mL)2 mL, 涡旋混匀, 于 $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 置冰箱 ($4\ ^\circ\text{C}$) 内放置 30 min, 取上层乙醚溶液作为样品溶液进样分析。

2.4.3 方法学验证及样品测定 取对照品贮备液、内标溶液适量, 依次配成各对照品质量浓度约为 0.25, 0.125, 0.05, 0.025, 0.0125, 0.005, $0.002\ 5\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列对照品溶液 (内标质量浓度 $0.1\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), 按 2.4.1 项下条件检测。以指标成分峰面积与内标峰面积的比值 (Y) 与质量浓度 (X) 进行线性回归分析。取质量浓度均为 $0.25\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液, 分别于 0, 1, 2 d 重复进样 6 次分析, 以指标成分峰面积与内标峰面积的比值计算 RSD, 考察检测系统的精密度。制备 6 份样品溶液进样分析, 以指标成分峰面积与内标峰面积的比值计算 RSD, 考察该方法的重复性。样品溶液室温放置, 分别于制备后 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 测定, 以指标成分峰面积与内标峰面积的比值计算 RSD, 考察样品溶液室温稳定性。取已知指标成分含量的粪便样品 6 份, 每份 2.0 g, 分别加入质量浓度均为 $0.125\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液 2.0 mL, 按 2.4.2 项下方法制备供试品溶液, 计算回收率。

2.5 肠道菌群结构变化的分析

2.5.1 粪便样品肠道菌群总 DNA 的提取与检测 采用苯酚三氯甲烷抽提法^[17]。将粪便样品 0.2 g 置于 2 mL 离心管中, 加入 PBS 1 mL, 充分均质化, $200\times g$ 离心 6 min, 取上清; 向沉淀中加入 PBS 1 mL, 充分均质化, $200\times g$ 离心 6 min, 取上清。合并 2 次上清, 加入 20% PVP 20 μL , $300\times g$ 离心 6 min, 取上清, $12\ 000\times g$ 离心 6 min, 收集菌体。菌体沉淀用 PBS 1.8 mL 洗涤 1 次, $12\ 000\times g$ 离心 6 min, 菌体沉淀中加入裂解液 I 300 μL , 10% 溶菌酶 100 μL , 1% 核糖核酸酶 (RNase) 20 μL , 混匀后 $37\ ^\circ\text{C}$ 温浴 30 min。加入裂解液 II 300 μL 和 20% SDS 50 μL , 混匀后冰浴 5 min。加入 1% PVP 50 μL , 饱和酚 400 μL 和三氯甲烷-异戊醇 (24:1) 混合液 400 μL , $13\ 000\times g$ 离心 8 min, 取上清; 加入三氯甲烷-异戊醇 (24:1) 混合液 800 μL , 混匀, $13\ 000\times g$ 离心 8 min, 取上清。重复用三氯甲烷-异戊醇 (24:1) 混合液抽提 1 次。加入 $3\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸钠溶液 50 μL 和乙醇 1 mL, 于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 沉淀 2 h 以上, $14\ 000\times g$ 离心 15 min, 用 70% 乙醇洗涤 1 次, 真空干燥, 加无菌去离子水 100 μL 使溶解。总 DNA 样品在 1% 琼脂糖凝胶 (含 EB 质量浓度 $0.5\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 中电泳检测, 电泳缓冲液为 $1\times\text{TAE}$,

电场强度 $5\ \text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$, 电泳时间 45 min。经凝胶成像仪上观察、检测并记录结果。

2.5.2 16S rDNA V3 区扩增反应和产物检测^[18]

扩增反应体系 50 μL , 反应体系中含有 DNA 样品 2 μL , Taq 酶缓冲液 5 μL , dNTPs 4 μL , 2 个扩增引物各 4 μL , $25\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{MgCl}_2$ 溶液 4 μL , 去离子水 26.2 μL , Taq DNA 聚合酶 0.8 μL 。扩增程序为 $94\ ^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; $94\ ^\circ\text{C}$ 变性 30 s, $56\ ^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 60 s, 30 个循环; $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。16S rDNA V3 区扩增反应产物在 $1\times\text{TAE}$ 配制的 2% 琼脂糖凝胶 (含 EB 质量浓度 $0.5\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 中电泳检测, 电泳缓冲液为 $1\times\text{TAE}$, 电场强度 $5\ \text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$, 电泳时间 55 min, 电泳后在凝胶成像仪上检测并记录结果。

2.5.3 PCR-DGGE 分析 采用 DCode™ 型突变检测系统对 PCR 产物进行分离。电泳条件为 8% 丙烯酰胺凝胶, 变性剂线性梯度范围 35% ~ 60% (100% 变性剂相当于 $7\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素和 40% 去离子甲酰胺), $1\times\text{TAE}$ 缓冲液, 于 120 V 和 $60\ ^\circ\text{C}$ 电泳 8 h, 硝酸银染色。染色步骤为加入固定液 (10% 乙醇, 0.5% 冰乙酸) 固定 15 min, 去离子水洗 2 次; 0.2% 硝酸银染色 15 min, 去离子水洗 2 次; 加入显色液 (3.0% NaOH, 0.5% 甲醛)。染色后在凝胶成像仪上检测并记录结果。

2.5.4 PCR-DGGE 数据处理 采用 GIS-2010 型凝胶成像仪对造模前、造模结束和治疗结束各阶段大鼠 DGGE 指纹图谱进行面积积分。采用 Shannon's 法计算各阶段大鼠肠道菌群 DGGE 指纹图谱的多样性指数。Shannon's 计算公式为多样性指数 (H') = $-\sum p_i \ln p_i$, 式中 $p_i = n_i/N$, n_i 为第 i 个波峰的面积, N 为所有波峰的面积。采用 Sorenson 配对相似性系数法分析造模结束、治疗结束与造模前大鼠肠道菌群 DGGE 指纹图谱的相似性, 计算公式为相似性系数 (C_s) = $2\times j/(a+b)\times 100\%$, 式中 a 为某一样品 DGGE 指纹图谱的条带数目; b 为另一样品 DGGE 指纹图谱条带数目; j 为两图谱的共有条带数目。

3 结果

3.1 气相色谱分析方法学验证^[19-20] 以 2-甲基戊酸为内标, 采用极性毛细管色谱柱建立气相色谱分析方法, 样品通过硫酸溶液酸化、乙醚 (含内标) 萃取, 无需衍生化, 乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸、己酸分离效果良好。对 7 种 SCFAs 进行线性关系、定量测定, 结果表明在一定质量浓度范围内

均具有良好线性, 相关系数 r 均 > 0.999 (以成分与内标的峰面积比值为纵坐标, 质量浓度为横坐标); 日内和日间精密度试验的 RSD 处于 $1.9\% \sim 3.7\%$, 表明

仪器精密度良好; 溶液稳定性试验, 样品室温放置 12 h 是稳定的; 回收率处于 $87.3\% \sim 101.6\%$, 见表 1。表明该方法适用于粪便样品中 SCFAs 的测定。

表 1 短链脂肪酸分析的方法学验证

Table 1 Validation of analytical method for short-chain fatty acids

化合物	回归方程	r	定量限 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	回收率 ($n=6$) / %	
				平均值	RSD
乙酸	$Y = 3.86587X - 0.00483$	0.9998	2.50	93.4	3.1
丙酸	$Y = 6.50451X - 0.00785$	0.9998	1.25	95.3	2.2
异丁酸	$Y = 7.86314X - 0.00935$	0.9998	1.25	97.9	2.8
丁酸	$Y = 8.05382X - 0.00896$	0.9998	1.25	100.2	2.6
异戊酸	$Y = 9.00407X - 0.00990$	0.9998	1.25	101.6	3.2
戊酸	$Y = 9.09902X - 0.00753$	0.9999	1.25	91.2	3.4
己酸	$Y = 10.33379X + 0.00372$	0.9999	1.25	87.3	2.1

注: 线性范围均为 $0.0025 \sim 0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

3.2 粪便短链脂肪酸含量变化的分析 对造模前、造模结束、治疗结束的各组大鼠粪便进行分析, 总 SCFAs 和乙酸、丙酸、丁酸的含量变化见表 2。结果发现造模前(第 0 天), 各组大鼠粪便中 4 项检测指标与空白组比较均无显著性差异。造模结束(第 11 天)时, 空白组大鼠粪便中总 SCFAs 和乙酸、丙酸、丁酸的质量分数与造模前相比无明显变化; 其他各组大鼠粪便中 4 项检测指标与空白组相比均极显著降低 ($P < 0.01$)。治疗结束(第 18 天)时, 与空白组比较, 整肠生颗粒组、四君子汤组、人参组、白术组、茯苓组大鼠粪便中 4 项检测指标无显著差异, 而模型组、炙甘草组大鼠粪便中这 4 项检测指标则均极显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 白术组、四君子汤组、整肠生颗粒组、茯苓组、人参组大鼠粪便中这 4 项检测指标均显著升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), 而炙甘草组大鼠粪便中这 4 项检测指标则均无显著性差异。

3.3 粪便肠道菌群结构变化的分析

3.3.1 肠道菌群 16S rDNA-PCR-DGGE 指纹图谱

对番泻叶脾虚模型大鼠造模前、造模结束和治疗结束的粪便中肠道菌群总 DNA 样品进行 16S rDNA-PCR V3 区 PCR 扩增后, 采用 DGGE 进行分析, 结果发现大鼠粪便肠道菌群 DGGE 指纹图谱约存在 30 条明显条带。造模组同只大鼠造模前、造模结束的图谱中部分条带消失或变浅, 同时一些条带出现或增强, 表明造模结束原有肠道菌群的微生态平衡被破坏, 菌群结构多样性发生了改变。治疗结束电泳图中部分条带恢复出现或增强, 说明菌群结

构多样性有所恢复。其可能原因为造模过程中原有的优势菌种生长被抑制, 另外一些菌种生长得到促进, 治疗过程中原有的优势菌种生长有所恢复, 导致条带数量上的明显变化。

3.3.2 肠道菌群 16S rDNA-PCR-DGGE 指纹图谱的多样性指数分析 多样性指数可用于评价肠道菌群种类的整体变化^[21-24], 该指数增加说明菌群种类可能增多, 反之则说明菌群种类可能减少, 可反映菌群结构的整体情况。通过 16S rDNA-PCR-DGGE 指纹图谱, 采用 Shannon's 法计算各组大鼠造模前、造模结束和治疗结束粪便样品中肠道菌群的多样性指数, 见表 3。

由表 3 可知, 造模前(健康状态下)各组大鼠肠道菌群的多样性指数处于 $2.74 \sim 2.85$, 各组间无显著性差异, 48 只大鼠肠道菌群的多样性指数平均值 2.78。给予番泻叶造模后, 各造模组大鼠肠道菌群的多样性指数与空白组相比极显著降低 ($P < 0.01$), 42 只造模大鼠肠道菌群多样性指数平均值 2.46, 表明大鼠经灌胃番泻叶塑造脾虚模型后, 肠道菌群微生态平衡遭到破坏, 菌群种类下降。给予药物治疗至第 18 天, 与模型组相比, 整肠生颗粒组、四君子汤组、白术组大鼠肠道菌群的多样性指数极显著升高 ($P < 0.01$), 人参组、茯苓组、炙甘草组大鼠肠道菌群多样性指数显著升高 ($P < 0.05$)。

3.3.3 肠道菌群 16S rDNA-PCR-DGGE 指纹图谱的相似性系数分析 相似性系数可反映肠道菌群指纹图谱间的差异程度。采用 Sorenson 配对相似性系数法比较造模前、造模结束和治疗结束大鼠肠道菌

表 2 不同组别大鼠粪便样品中短链脂肪酸的质量分数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 2 Contents of short-chain fatty acids in rat feces of different groups ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	考察指标	第 0 天	第 11 天	第 18 天
模型	乙酸	0.86 ± 0.04	0.36 ± 0.01 ¹⁾	0.42 ± 0.10 ¹⁾
	丙酸	0.87 ± 0.04	0.08 ± 0.01 ¹⁾	0.39 ± 0.08 ¹⁾
	丁酸	1.44 ± 0.03	0.63 ± 0.01 ¹⁾	0.70 ± 0.14 ¹⁾
	总 SCFAs	4.11 ± 0.08	1.26 ± 0.04 ¹⁾	1.86 ± 0.35 ¹⁾
空白	乙酸	0.90 ± 0.02	0.82 ± 0.03	0.63 ± 0.05
	丙酸	0.88 ± 0.08	0.93 ± 0.04	0.62 ± 0.09
	丁酸	1.53 ± 0.09	1.67 ± 0.03	1.64 ± 0.38
	总 SCFAs	4.17 ± 0.14	4.03 ± 0.08	3.49 ± 0.62
整肠生颗粒	乙酸	0.89 ± 0.04	0.37 ± 0.03 ¹⁾	0.58 ± 0.09 ²⁾
	丙酸	0.83 ± 0.04	0.07 ± 0.00 ¹⁾	0.57 ± 0.11 ²⁾
	丁酸	1.49 ± 0.06	0.62 ± 0.02 ¹⁾	1.67 ± 0.31 ³⁾
	总 SCFAs	4.08 ± 0.11	1.25 ± 0.05 ¹⁾	3.31 ± 0.56 ³⁾
四君子汤	乙酸	0.92 ± 0.02	0.38 ± 0.02 ¹⁾	0.62 ± 0.03 ³⁾
	丙酸	0.81 ± 0.03	0.38 ± 0.02 ¹⁾	0.61 ± 0.09 ²⁾
	丁酸	1.54 ± 0.03	0.63 ± 0.01 ¹⁾	1.45 ± 0.18 ³⁾
	总 SCFAs	4.14 ± 0.08	1.27 ± 0.03 ¹⁾	2.98 ± 0.06 ³⁾
人参	乙酸	0.90 ± 0.07	0.39 ± 0.02 ¹⁾	0.58 ± 0.08 ²⁾
	丙酸	0.79 ± 0.03	0.39 ± 0.02 ¹⁾	0.52 ± 0.06 ²⁾
	丁酸	1.47 ± 0.05	0.63 ± 0.01 ¹⁾	1.23 ± 0.23 ²⁾
	总 SCFAs	4.03 ± 0.16	1.28 ± 0.03 ¹⁾	2.78 ± 0.36 ³⁾
白术	乙酸	0.93 ± 0.02	0.36 ± 0.02 ¹⁾	0.63 ± 0.03 ³⁾
	丙酸	0.81 ± 0.02	0.36 ± 0.02 ¹⁾	0.73 ± 0.02 ³⁾
	丁酸	1.41 ± 0.06	0.60 ± 0.02 ¹⁾	1.93 ± 0.02 ³⁾
	总 SCFAs	4.09 ± 0.09	1.21 ± 0.05 ¹⁾	3.97 ± 0.04 ³⁾
茯苓	乙酸	0.94 ± 0.03	0.37 ± 0.01 ¹⁾	0.63 ± 0.11 ²⁾
	丙酸	0.82 ± 0.04	0.37 ± 0.01 ¹⁾	0.54 ± 0.05 ²⁾
	丁酸	1.46 ± 0.04	0.62 ± 0.02 ¹⁾	1.70 ± 0.07 ³⁾
	总 SCFAs	4.14 ± 0.13	1.26 ± 0.05 ¹⁾	3.37 ± 0.22 ³⁾
炙甘草	乙酸	0.87 ± 0.03	0.38 ± 0.01 ¹⁾	0.38 ± 0.06 ¹⁾
	丙酸	0.91 ± 0.07	0.38 ± 0.01 ¹⁾	0.44 ± 0.10 ¹⁾
	丁酸	1.46 ± 0.03	0.65 ± 0.02 ¹⁾	0.72 ± 0.14 ¹⁾
	总 SCFAs	4.20 ± 0.08	1.30 ± 0.03 ¹⁾	1.80 ± 0.32 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

群 16S rDNA-PCR-DGGE 图谱的相似性,见表 4。结果发现各造模组大鼠造模后 PCR-DGGE 图谱与造模前图谱的相似性系数处于 41.56% ~ 46.37%,与空白组比较均显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),表明造模后肠道菌群组成发生了明显的改变。给予药物

表 3 不同组别大鼠粪便中肠道菌群的多样性指数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 3 Diversity index of intestinal flora in rat feces of different groups ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	第 0 天	第 11 天	第 18 天
模型	2.80 ± 0.04	2.45 ± 0.05 ¹⁾	2.47 ± 0.06
空白	2.85 ± 0.10	2.89 ± 0.17	3.03 ± 0.13
整肠生颗粒	2.77 ± 0.03	2.52 ± 0.14 ¹⁾	2.72 ± 0.02 ³⁾
四君子汤	2.76 ± 0.04	2.48 ± 0.07 ¹⁾	2.75 ± 0.07 ³⁾
人参	2.76 ± 0.04	2.39 ± 0.05 ¹⁾	2.52 ± 0.06 ²⁾
白术	2.76 ± 0.04	2.43 ± 0.02 ¹⁾	2.65 ± 0.05 ³⁾
茯苓	2.79 ± 0.08	2.49 ± 0.06 ¹⁾	2.60 ± 0.07 ²⁾
炙甘草	2.74 ± 0.05	2.47 ± 0.05 ¹⁾	2.58 ± 0.06 ²⁾

治疗至第 18 天,整肠生颗粒组、四君子汤组、人参组、白术组、茯苓组的肠道菌群均有所恢复,与模型组比较,白术组 PCR-DGGE 指纹图谱与造模前图谱的相似性系数极显著升高 ($P < 0.01$),整肠生颗粒组、四君子汤组、人参组、茯苓组的相似性系数均显著升高 ($P < 0.05$),炙甘草组的相似性系数则无显著性差异。

表 4 不同组别大鼠粪便样品中肠道菌群的相似性指数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	第 11 天	第 18 天
模型	46.37 ± 6.09 ¹⁾	47.54 ± 4.05
空白	55.22 ± 7.10	63.27 ± 10.73
整肠生颗粒	41.56 ± 3.68 ¹⁾	54.36 ± 3.63 ³⁾
四君子汤	42.16 ± 7.99 ¹⁾	58.81 ± 9.76 ³⁾
人参	45.73 ± 6.32 ¹⁾	51.64 ± 7.06 ³⁾
白术	43.42 ± 2.94 ²⁾	58.94 ± 3.75 ⁴⁾
茯苓	44.99 ± 5.40 ¹⁾	54.15 ± 4.29 ³⁾
炙甘草	44.80 ± 2.95 ²⁾	48.37 ± 3.01

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

据文献报道,肠道菌群中不同菌属可生产不同的 SCFAs,双歧杆菌主要生产乙酸和乳酸,乳酸杆菌主要生产乙酸和乳酸,拟杆菌属主要生产乙酸、丙酸、琥珀酸,梭杆菌主要生产丁酸,乙酸、丙酸、丁酸的含量变化与肠道益生菌具有正相关性,其水平可直接反映肠道菌群的健康状况^[25]。因此,采用乙酸、丙酸、丁酸和总 SCFAs(包含异丁酸、异戊酸、戊

酸和己酸)的含量水平作为脾虚证进展变化的检测指标之一。

本研究分析了四君子汤及其单味药水煎液对大鼠粪便中总 SCFAs, 乙酸, 丙酸, 丁酸质量分数以及肠道菌群结构的影响, 发现大鼠经灌胃番泻叶塑造脾虚模型后, 肠道菌群微生态平衡遭到破坏, 肠道益生菌数量减少、菌群种类下降, 提示肠道菌群组成发生了明显改变; 给予药物治疗至第 18 天, 与模型组比较, 白术组大鼠粪便中的 SCFAs 水平以及肠道菌群多样性和相似性系数均极显著升高 ($P < 0.01$), 表明脾虚大鼠肠道菌群得到了很好的恢复, 白术组中丙酸、丁酸含量明显高于其他单味药组, 提示白术在四君子汤中的贡献度最大, 其次为茯苓、人参; 除了多样性指数有所升高(这可能是自然恢复的结果), 炙甘草组大鼠粪便中的 SCFAs 水平以及肠道菌群相似性系数与模型组比较均无显著性差异, 推测炙甘草对脾虚大鼠肠道菌群的恢复没有促进作用。该研究结果可为进一步阐明四君子汤调节脾虚证肠道菌群失调的物质基础提供参考。

四君子汤中白术、茯苓及人参对脾虚证模型肠道微生物修复作用已有研究报道^[26-28], 且与本研究的分析结果一致。本研究中炙甘草对脾虚大鼠肠道菌群的恢复没有促进作用, 但文献[29]报道甘草可以通过肠上皮细胞增殖凋亡、黏膜保护修复对脾虚证中损伤的胃肠黏膜组织进行修复, 其可能直接作用于胃肠道发挥协同疗效, 这还有待进一步研究证实。已有文献报道, 采用 16S rDNA 基因测序技术可较好地分析肠道菌群特定菌属的变化情况^[30-32], 后续可参考相关技术进一步探讨四君子汤及其单味药水煎液(尤其是白术)对相关功能菌属的调节恢复作用, 以明确该方改善脾虚证肠道菌群失调的物质基础。

[参考文献]

[1] 巩昌镇, 刘一凡, 杨佃会, 等. 四君子汤[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2009: 3, 31.

[2] 吴三明, 张万岱. 脾虚泄泻患者肠道微生物生态学的初步研究[J]. 中国中西医结合脾胃杂志, 1996, 4(4): 203-204.

[3] 王占国. 中医“脾”与消化道正常菌群[J]. 中国微生物生态学杂志, 1991, 3(2): 65-68.

[4] 马祥雪, 王风云, 符俊杰, 等. 基于肠道菌群的中医健脾方剂作用机制的研究现状与思考[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(5): 210-215.

[5] Topping D L, Clifton P M. Short-chain fatty acids and

human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides [J]. *Physiol Rev*, 2001, 81(3): 1031-1064.

[6] Hold G L, Schwiertz A, Aminov R I, et al. Oligonucleotide probes that detect quantitatively significant groups of butyrate-producing bacteria in human feces [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(7): 4320-4324.

[7] Wong J M W, Jenkins D J A. Carbohydrate digestibility and metabolic effects [J]. *J Nutr*, 2007, 137(11 Suppl): 2539S-2546S.

[8] 刘松珍, 张雁, 张名位, 等. 肠道短链脂肪酸产生机制及生理功能的研究进展 [J]. *广东农业科学*, 2013, 40(11): 99-103.

[9] 严梅楨, 李志军, 谢念祥, 等. 四君子汤对实验性脾虚小鼠肠道菌群的影响 [J]. *中国微生态学杂志*, 1989, 1(1): 40-43.

[10] 任光友, 张贵林, 卢素琳, 等. 四君子汤对动物肠菌失调及正常胃肠功能的药理研究 [J]. *中成药*, 2000, 22(7): 504-506.

[11] 任晓风, 吴莲波, 王伟明, 等. 四君子汤对脾气虚证调节作用的实验研究 [J]. *中国中医药科技*, 2005, 12(6): 359-360.

[12] 彭颖, 金晶, 杨静玉, 等. 3 种健脾补气方药对脾气虚证大鼠肠道菌群的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(21): 2530-2534.

[13] 王卓, 彭颖, 李晓波. 四君子汤对两种脾虚模型大鼠肠道菌群紊乱的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2009, 29(9): 825-829.

[14] 曲长江, 林庶如, 夏淑杰, 等. 苦寒泻下两种脾虚模型的免疫学比较研究 [J]. *辽宁中医杂志*, 1999, 26(3): 133-134.

[15] 沈丽波, 钱会南. 脾虚模型实验研究方法概述 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2005, 12(1): 93-95.

[16] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 935.

[17] 金晶, 彭颖, 李晓波. 快速提取肠道微生物基因组 DNA 的方法 [J]. *现代生物医学进展*, 2007, 7(1): 100-103.

[18] 彭颖. 脾虚证肠道菌群基因指纹评价指标及相关药物的筛选方法 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2008.

[19] ZHAO G H, Nyman M, Jönsson J Å. Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography [J]. *Biomed Chromatogr*, 2006, 20(8): 674-682.

[20] 贾益群, 叶福媛, 王双, 等. 生物样品中短链脂肪酸的快速提取与分析方法 [J]. *实验室研究与探索*, 2012,

- 31(7):262-264.
- [21] 杨泽锐,曾桂梅,彭丽华,等. 红景天破壁饮片对小鼠肠道菌群影响的初步研究[J]. 中国中药杂志,2015,40(15):3053-3058.
- [22] 贾宏信,苏米亚,陈文亮,等. 婴儿喂养方式的改变对肠道菌群多样性的影响[J]. 中国微生态学杂志,2016,28(12):1365-1369.
- [23] 吴莉娟,孙文,吴丽丽,等. 糖耐康对 T2DM 大鼠 ZDF 肠道菌群结构的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(8):98-104.
- [24] 周霖,岑泳欣,王立生,等. 小檗碱对肠易激综合征大鼠肠道菌群的影响[J]. 中国微生态学杂志,2018,30(7):772-776.
- [25] 王玉蕾,郑跃杰. 肠道中短链脂肪酸与过敏性疾病关系的研究进展[J]. 中国微生态学杂志,2013,25(1):104-108.
- [26] 吴鹏,李慧芬,刘江亭,等. 白术及其制剂调整脾虚证肠道菌群紊乱的研究概况[J]. 山东中医杂志,2015,34(7):564-565.
- [27] 罗云波,贾波,祝捷,等. 白术茯苓汤及水煎液提取分离组分对脾气虚大鼠 VIP 受体的影响[J]. 时珍国医国药,2010,21(5):1045-1046.
- [28] 潘爱珍,易伟民,余晓娟,等. 人参总皂苷对脾虚模型大鼠的保护作用研究[J]. 中国药房,2013,24(39):3682-3684.
- [29] 曾星,贺毅,周丹,等. 甘草对脾虚证消化道黏膜及细胞保护的分子药理机制研究进展[J]. 时珍国医国药,2010,21(8):2030-2031.
- [30] 舒青龙,王萍,封勇,等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(21):82-87.
- [31] 王丽芳,高文远,徐鑫,等. 神曲鲜干品组方对食积小鼠胃肠动力及肠道菌群调整的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(4):20-24.
- [32] 张宁,李自辉,赵洪伟,等. 寒凝血瘀证大鼠的肠道菌群变化与粪便代谢特征分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(2):79-85.

[责任编辑 刘德文]