

基于16S rDNA测序的肠道菌群探讨解郁祛痰化浊方对 高脂饮食大鼠肠-肝轴的影响

李娜¹, 吴阳阳², 段锦龙¹, 郑旭彤¹, 姚魁武^{1*}

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053;

2. 洛阳市中医院, 河南 洛阳 471000)

[摘要] **目的:**研究解郁祛痰化浊方(JQHP)对高脂饮食大鼠肠道菌群的影响,探讨中药调控肠道微生物群进而恢复肠-肝轴的平衡。**方法:**将70只雄性SPF级别Wistar大鼠随机分为正常组(10只)与模型组(60只),正常组饲喂正常饲料,模型组饲喂高脂饲料。12周后将模型组随机分为6组,每组10只,即模型组,血脂康组,立普妥组,JQHP低、中、高剂量组。JQHP低、中、高剂量组分别灌胃JQHP颗粒剂0.4,0.8,1.6 g·kg⁻¹,立普妥组予立普妥2 mg·kg⁻¹,血脂康组予血脂康0.1 g·kg⁻¹,正常组和模型组大鼠灌胃同等量蒸馏水,连续灌胃8周后收集粪便,进行16S rRNA基因测序,行腹主动脉取血检测血脂,取肝脏组织及回肠组织苏木素-伊红(HE)染色后进行病理形态学观察。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠血脂四项总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)均见明显升高,高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)降低($P<0.01$);与模型组比较,血脂康组、立普妥组TC,TG显著性下降($P<0.01$),血脂康组HDL-C升高($P<0.05$)。JQHP中剂量组较模型组对肝脏脂肪样变有一定的缓解作用,可以减轻炎症细胞的浸润情况。JQHP可使回肠结构淋巴组织增生情况好转,且中剂量组疗效最显著。Shannon曲线结果表明,与正常组比较,JQHP中剂量组显著提高($P<0.01$);与模型组比较,JQHP中、高剂量组明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);与JQHP中剂量组比较,其他用药组降低($P<0.05$, $P<0.01$)。主成分多样性分析(PCA)示中药中剂量组多样性和丰度高于其他用药组。线性判别分析(LDA)中,与正常组比较,模型组拟杆菌纲,瘤胃球菌科,拟杆菌S24-7,瘤胃球菌UCG-005下调($P<0.01$),脱硫弧菌目、丹毒丝菌目、毛螺菌科上调($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较,JQHP中剂量组的拟杆菌纲,瘤胃球菌科,拟杆菌S24-7,瘤胃球菌UCG-005上调($P<0.05$, $P<0.01$),丹毒丝菌目下调($P<0.01$)。与JQHP中剂量组比较,其他用药组拟杆菌纲,瘤胃球菌科,拟杆菌S24-7,瘤胃球菌UCG-005中降低($P<0.05$, $P<0.01$),在丹毒丝菌目、毛螺菌科中升高($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论:**JQHP调整肠道物种丰度和多样性,改善肝脏组织和回肠黏膜状态,调节血脂水平,恢复正常肠道生态环境,可能与调节与炎症相关的肠道菌群而恢复肠-肝轴平衡有关,以中剂量组效果最佳。

[关键词] 解郁祛痰化浊方; 肠道菌群; 高脂血症; 肠-肝轴; 16S rDNA 测序

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)09-0077-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210327

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20201215.1038.004.html>

[网络出版日期] 2020-12-15 11:32

Explore Effect of Jieyu Qutan Huazhuo Prescription on Gut-liver Axis of Rats with High-fat Diet Based on 16S rDNA Sequencing

LI Na¹, WU Yang-yang², DUAN Jin-long¹, ZHENG Xu-tong¹, YAO Kui-wu^{1*}

(1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China;

2. Luoyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Luoyang 471000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Jieyu Qutan Huazhuo prescription (JQHP) on the gut microbiota of rats with high-fat diet, and to explore the effect of Chinese medicine on the regulation of gut

[收稿日期] 20201115(012)

[基金项目] 中国中医科学院中医药“一带一路”合作专项项目(GH201911);中国中医科学院自主选题第十一批项目(ZZ11-031)

[第一作者] 李娜,在读博士,从事中西医结合防治心血管病研究,E-mail:doctorlina@163.com

[通信作者] *姚魁武,博士,教授,博士生导师,从事中西医结合防治心血管病研究,E-mail:yaokuiwu@126.com

microflora and the restoration of gut-liver axis balance. **Method:** Seventy male SPF Wistar rats were randomly divided into a normal group of 10 and a model group of 60. Mice in the normal group were fed with normal diet and mice in the model group were fed high-fat diet. After 12 weeks, the model group was randomly divided into 6 groups with 10 animals in each group, namely the model group, Xuezhikang group, Liputuo group, and low, medium and high-dose groups of JQHP. The JQHP low-dose, medium-dose and high-dose rats were intragastrically administered with 0.4, 0.8, 1.6 g·kg⁻¹, respectively, rats in Liputuo group with Liputuo 2 mg·kg⁻¹, rats in Xuezhikang group with Xuezhikang 0.1 g·kg⁻¹. The rats in the normal group and the model group were intragastrically administered with the same amount of distilled water. Stool were collected after continuous gavaging for 8 weeks, 16S rRNA gene sequencing was performed, blood was collected from the abdominal aorta to detect blood lipids, and the liver tissue and ileum tissue were collected for hematoxylin and eosin (HE) staining for pathomorphological observation. **Result:** Compared with the normal group, the total cholesterol (TC), triglyceride (TG), and low-density lipoprotein (LDL-C) in the model group were significantly increased, while the high-density lipoprotein (HDL-C) was decreased ($P<0.01$). Compared with the model group, TC and TG values were decreased significantly in Xuezhikang group ($P<0.01$), HDL-C value was increased ($P<0.05$), and in the Liputuo group TC and TG were decreased significantly ($P<0.01$). Compared with the model group, the middle-dose group of JQHP had a certain alleviating effect on liver steatosis and could reduce the infiltration of inflammatory cells. The JQHP could improve the proliferation of lymphoid tissues in the ileal structure, and the middle-dose group has the most significant effect. The results of Shannon curve showed that compared with the normal group, the middle-dose group of JQHP increased significantly ($P<0.01$). Compared with the model group, the middle and high-dose group of JQHP increased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the middle-dose group of JQHP, the other drug group decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). Principal component diversity analysis(PCA) showed that the diversity and abundance in the middle-dose JQHP group were higher than those in other drug groups. In linear discriminant analysis(LDA), compared with the normal group, Bacteroidia, Ruminococcaceae, *Bacteroides* S24-7, and *Rumencoccus* UCG-005 were down-regulated in the model group ($P<0.01$), while the orders of Desulfovibrionales, Erysipelotrichales and Lachnospiraceae were up-regulated in the model group ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, the Bacteroidia, Ruminococcaceae, *Bacteroides* S24-7, and *Rumencoccus* UCG-005 in the middle-dose JQHP group were increased ($P<0.05$, $P<0.01$), and the orders of Erysipelotrichales were decreased ($P<0.01$). Compared with the middle-dose JQHP group, Bacteroidia, Ruminococcaceae, *Bacteroides* S24-7, and *Rumencoccus* UCG-005 in other drug groups were reduced ($P<0.05$, $P<0.01$), and the order of Erysipelotrichales and Lachnospiraceae were increased ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** JQHP can regulate the abundance and diversity of the gut microbiota, improve the state of liver tissue and ileum mucosa, regulate blood lipid levels, and restore the normal intestinal ecological environment. It may be related to the regulation of inflammation-related gut microbiota in order to restore the balance of the gut-liver axis, and the middle-dose JQHP group has the best effect.

[Key words] Jieyu Qutan Huazhuo prescription; gut microbiota; hyperlipidemia; gut-liver axis; 16S rDNA sequencing

高脂血症作为动脉粥样硬化、冠心病等心脑血管疾病的独立危险因素已经得到越来越多的关注。肠道菌群是人体的“第二基因组”，中药汤剂经口服进入消化道，势必影响肠道菌群的结构，从而影响肠道微生物群而发挥作用^[1-2]。中医脾胃包含大肠、小肠在内的整个消化系统，《黄帝内经·灵枢》云：“大肠、小肠皆属于胃。”国医大师薛伯寿认为肝气

郁结，阻碍气机，脾失健运，水湿内停，日久痰瘀互结，导致高脂血症的发生，气郁痰阻是高脂血症的常见病机。本研究采用高脂饮食制备大鼠高脂血症模型，采用高通量测序 Illumina Miseq 平台的 16S rRNA 技术，探究解郁祛痰化浊方(JQHP)调节脂代谢在高脂饮食大鼠体内肠道菌群变化的作用机制。

1998年MARSHALL^[3]提出肠-肝轴学说,在肠道屏障受损后,细菌移位产生的内毒素进入门脉系统,肝脏内的库普弗细胞被激活释放炎症因子,造成器官的损伤。肠道菌群调节血脂在血与肝脏的重分布,即血脂代谢的肠-肝轴:第一,正常肠道中一些菌群可以产生胆固醇氧化酶,在酶的作用下其降解产物和粪便一起排除体外^[4-5]。第二,胆汁酸与胆固醇结合成胆汁酸盐,胆汁酸盐可以增加胆固醇在水相中的溶解度,促使肝脏利用胆固醇合成胆汁酸增加,这样使得血中更多的胆固醇被转化,从而影响胆汁酸的肝肠循环达到血中胆固醇水平降低的目的^[6-7]。第三,肠道菌群存在降解酶系统,可以将多余的多糖和淀粉转化为短链脂肪酸,短链脂肪酸可以降低总胆固醇(TC)和甘油三酯(TG),部分吸收入血,促进游离脂肪酸的吸收,改善炎症状态^[8]。高脂饮食产生的一部分代谢产物会增加内毒素水平,增加肠道的通透性,损伤肠道黏膜,破坏肠道菌群环境,且内毒素吸收入血循环,影响器官代谢^[9]。课题组在传承国医大师薛伯寿学术思想的基础上,以《太平惠民和剂局方》中的二陈汤和《丹溪心法》中的越鞠丸加减而组成JQHP,本实验采用观察高脂饮食大鼠肠道菌群和肝脏、回肠黏膜病理切片的方法,来研究JQHP降低血脂的可能机制,以及肠道微生物可能对肝脏和肠道的影响,这为进一步研究影响血脂代谢的菌群代谢产物的物质基础提供实验依据和理论依据。

1 材料

1.1 动物 雄性SPF级别Wistar大鼠,共70只,体重(200±20)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号SCXK(京)2016-0006,所有动物均饲养在中国中医科学院广安门医院动物房清洁级环境内,室温控制在21~24℃,自由取食水。本文所涉及的动物实验经中国中医科学院广安门医院实验动物福利伦理委员会批准,批准编号为IACUC-GAMH-2019-005。

1.2 动物饲料 基础普通饲料包括玉米、豆粕、鱼粉、面粉、麸皮、食盐磷酸铵钙、石粉、多种维生素、多种微量元素、氨基酸等构成。饲料由斯贝尔(北京)生物技术有限公司提供,合格证号为SCXK(京)2015-0015。

高脂饲料及其配方在维持饲料中添加1.2%胆固醇,20%蔗糖,15%猪油,0.2%胆酸钠,适量的酪蛋白、磷酸氢钙、石粉等。饲料均由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,合作证号SCXK(京)

2019-0008。

1.3 实验药品 JQHP组成:香附10g,陈皮8g,法半夏9g,茯苓10g,苍术10g,砂仁5g,神曲15g,焦山楂15g,炒栀子10g,川芎9g(新绿色药业公司,批号分别为20030073,20070198,20100192,20100186,20090056,20070063,20070086,20050133,20050107,20060096),共计原药101g。经新绿色药业公司邱小红药剂师鉴定,符合2015年版《中华人民共和国药典》的相关要求;立普妥片(辉瑞制药有限公司,批号AL6069);血脂康胶囊(北京北大维信生物科技有限公司,批号20180204)。

1.4 试剂 无水乙醇(天津致远化学试剂有限公司,批号20171113);切片石蜡[汇恒(南京)化工科技有限公司,批号39601095];中性树胶(北京索莱宝科技有限公司,批号20190827);苏木素、伊红(德国Leica公司,批号分别为20180302,814111);粪便基因组DNA提取试剂盒,6×DNA凝胶上样缓冲液[天根生化科技(北京)有限公司,批号分别为Q5306,U8113];Tris盐酸缓冲液(北京酷来搏科技有限公司,批号SL30193303);DNA聚合酶(美国KAPA Biosystems,批号0000112224);Advance DNA Strain(德国Midori Green公司,批号310718);AMPure XP核酸纯化试剂盒(美国Beckman Coulter公司,批号17620100);TG,TC,高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)直接法测定试剂盒(贝克曼库尔特公司,批号分别为AUZ8043,AUZ6799,AUZ7438,AUZ7440)。

1.5 仪器 LEICA RM2245型病理切片仪(德国Leica公司);DS-Ril-U3型数码显微成像系统(日本Nikon公司);DW-25L92型超低温保存箱(中国海尔);ST-5020型自动染色机(德国Leica公司);VORTEX-5型涡旋振荡仪(美国ScientificIndustries公司);Centrifuge 581015810R型高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);2720型热循环PCR仪(中国赛默飞世尔公司);164-5050型电泳仪(美国Bio-Rad公司);ALpha凝胶成像系统(美国ProteinSimple公司);Hiseq2500/1500型测序仪(美国Illumina公司);07256型烤箱(中国一恒科学仪器有限公司);ECLIPSE E100型光学显微镜,AU5800型全自动生化分析仪(日本Olympus公司)。

2 方法

2.1 高脂血症大鼠模型的制备及给药 把70只Wistar大鼠随机分为正常组,模型组,血脂康组,立

普妥组, JQHP低、中、高剂量组, 每组10只。其中普通组大鼠给予普通饲料喂养, 高脂组大鼠给予高脂饲料喂养, 均自由摄食、饮水12周, 以TC, TG和LDL-C含量的显著升高为标准, 建立高脂血症动物模型^[10]。

参照《药理实验方法学》^[11]进行受试药物的配制, JQHP的临床用量为成人质量70 kg计, 共计生药101 g, 其临床剂量为 $1.44 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。参照大鼠与人的临床等效剂量关系, 人(70 kg)与大鼠(0.2 kg)间药量折算系数为6.3。故确定JQHP给药中剂量组生药剂量为 $1.44 \times 6.3 = 9.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 成人口服101 g生药对应的颗粒剂约为9.2 g, $101/9.2 = 11.0$, 因此所对应的的低剂量组为 $0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 中剂量颗粒剂为 $0.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 高剂量组为 $1.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。立普妥组的剂量为 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。血脂康组的剂量为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。在饲喂12周后, JQHP低、中、高剂量每日分别灌胃中药颗粒剂0.4, 0.8, $1.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 立普妥组予立普妥 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 血脂康组予血脂康 $0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 正常组和模型组大鼠灌胃同等量蒸馏水, 8周后取材。

2.2 大鼠血液生化指标的测定 在药物干预8周后, 大鼠禁食12~16 h, 不禁水, 根据大鼠体重, 用6%的水合氯醛麻醉后, 使用一次性采血针在大鼠腹主动脉采血4~6 mL。血液常温静置1 h, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min(离心半径10 cm), 分离上清即为血清, 运用全自动生化分析仪, 检测TC, TG, LDL-C, HDL-C。

2.3 大鼠肝脏组织苏木素-伊红(HE)染色病理观察 把大鼠肝脏用0.9%的盐水冲洗干净, 用滤纸吸干, 然后在肝脏左下缘1 cm处取肝脏的组织, 每只大鼠取材的部位大致一致。然后置于10%中性多聚甲醛溶液中保存, 取材完毕后, 送至广安门医院病理科实验室, 石蜡包埋、固定、脱水、包埋、染色等操作后, 置于400倍光学显微镜下观察肝细胞结构变化。

2.4 大鼠肠道黏膜组织HE染色病理观察 把给药8周后所有的大鼠麻醉后开腹, 在大鼠回盲部取回肠组织2 cm, 生理盐水清洗干净后, 固定在10%的中性福尔马林溶液中24 h, 脱水, 石蜡包埋, 切片。HE染色后, 组织切片在200倍光镜下观察大鼠回肠组织。

2.5 粪便取样与检测 药物干预8周后取材, 取材前1 d收集7组大鼠的新鲜正常粪便。收集粪便时戴一次性无菌手套, 左手抓住大鼠, 右手轻轻按揉大鼠的腹部, 刺激大鼠排便, 当有粪便排出时, 用镊

子夹取样本, 然后迅速放入冻存管内, 并迅速放入液氮中进行保存, 所有样本由中国科学院微生物研究所进行大鼠粪便总DNA提取建库及质检, 用KAPA HiFi扩增16S V3-4区等16S rRNA基因测序检测, 抽取DNA后使用1%琼脂糖凝胶电泳检测基因组DNA。按照实验操作说明对纯化的DNA组进行聚合酶链式反应(PCR)扩增。对样品进行PCR产物检测、纯化和定量, 所有条带均完整清晰、大小正确, 满足建库需要, 然后进行文库制备、文库质检、定量, 使用设定的TAG序列进行样本区分。采用Illumina HiSeq 2500高通量测序平台对检测合格的文库进行测序, 将测序所得的序列进行后续分析所需的高质量目标序列。基于优化序列进行操作分类单元(OTU)聚类分析和物种分类学(taxonomy)注释。基于OTU聚类结果进行多样性指数分析。基于分类学信息进行物种结构分析和物种差异分析。检测显著丰度差异特征, 并找到与丰度有显著性差异的类群使用非参数因子克鲁斯卡尔-沃利斯秩和检验); 线性判别分析(LDA)估测分析相应的差异物种对组间区别的影响程度, 在组与组之间寻找具有统计学差异的生物标识。

2.6 数据处理 应用SPSS 24.0统计软件进行统计分析计算, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。数据分析时先进行正态分析及方差齐性检验, 若二者均符合, 则组间比较采用单因素方差分析(ANOVA), 运用最小显著差异(LSD)-*t*法进行组间多重比较; 若不符合正态分布或方差齐性检验时, 则进行非参数秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 JQHP对大鼠血脂四项TC, TG, HDL-C, LDL-C的影响 与正常组比较, 模型组大鼠血脂四项TC, TG, LDL-C均见显著升高, HDL-C显著降低($P < 0.01$); 与模型组比较, 血脂康组TC, TG显著下降($P < 0.01$), HDL-C明显升高($P < 0.05$), 立普妥组TC, TG显著降低($P < 0.01$), JQHP低剂量组TC, TG显著降低($P < 0.01$), JQHP中剂量组TC, TG, LDL-C显著降低($P < 0.01$), QHP高剂量组TC, TG显著降低($P < 0.01$), HDL-C明显升高($P < 0.05$), 见表1。

3.2 JQHP对大鼠肝脏病理学的影响 结果显示, 正常组肝组织结构清晰完整, 无明显的脂肪样变和炎性浸润。模型组肝脏组织结构不完整, 肝细胞浆内有多数大小不等的脂肪滴, 肝板结构不清, 汇管区可见炎性细胞浸润, 并伴有坏死灶, 肝窦狭窄。血脂康组肝细胞区脂肪样变程度略小于模型组, 肝

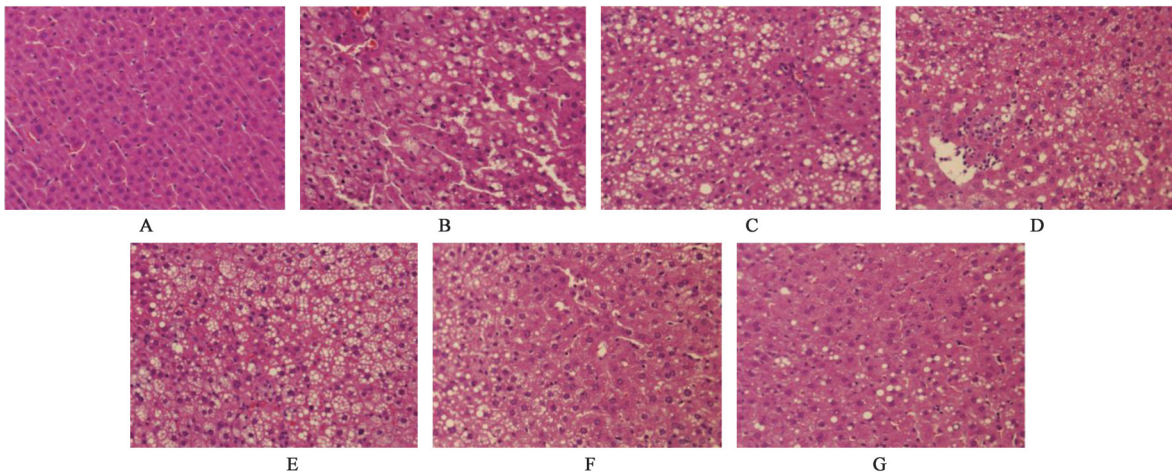
表 1 JQHP 对大鼠血脂四项变化的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TC	TG	HDL-C	LDL-C
正常		2.26±0.38	0.90±0.25	1.33±0.19	0.57±0.92
模型		3.22±0.75 ²⁾	1.69±0.28 ²⁾	0.89±0.10 ²⁾	1.02±0.39 ²⁾
血脂康	0.1	2.52±0.30 ⁴⁾	1.14±0.34 ⁴⁾	1.17±0.41 ³⁾	1.00±0.13
立普妥	0.002	2.20±0.18 ⁴⁾	1.16±0.19 ⁴⁾	0.99±0.23	0.90±0.16
JQHP	0.4	2.51±0.29 ⁴⁾	1.03±0.21 ⁴⁾	1.02±0.16	1.25±0.25
	0.8	2.12±0.27 ⁴⁾	1.01±0.29 ⁴⁾	1.09±0.24	0.77±0.16 ⁴⁾
	1.6	2.46±0.15 ⁴⁾	1.08±0.24 ⁴⁾	1.24±0.22 ⁴⁾	1.06±0.23

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⁾ $P<0.01$ 。

细胞体积增大。立普妥组肝细胞可见脂肪小泡,脂滴体积减小,其脂肪样变性和炎症细胞浸润有所减轻。JQHP 组肝细胞脂肪样变较模型组有所缓

解,肝细胞脂滴体积减小,炎症细胞浸润减轻,其中 JQHP 中剂量组程度优于低、高剂量组。见图 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 血脂康组;D. 立普妥组;E-G. JQHP 低、中、高剂量组(图 2,4 同)

图 1 JQHP 对大鼠肝脏病理学变化的影响 (HE, ×400)

Fig. 1 Effect of JQHP on changes of liver in different groups of high-fat diet rats (HE, ×400)

3.3 JQHP 对大鼠回肠黏膜组织病理学 HE 染色的影响 正常组回肠组织结构清晰、完整,皱襞、肠绒毛、黏膜层、肌层清晰可见,颜色鲜艳,没有发生明显的结构损伤。模型组回肠组织结构模糊,部分发生固有层的中断和消失。黏膜糜烂,肠道可见淋巴组织增生,存在慢性炎症的发生。立普妥组可见固有层的中断和消失,血脂康组回肠结构组织排列较立普妥组整齐。JQHP 各剂量组与模型组比较,组织形态均有所好转。JQHP 中剂量组回肠结构较完整,且淋巴组织增生情况不明显。见图 2。

3.4 JQHP 对大鼠肠道微生物测序结果的影响

3.4.1 高脂饮食大鼠不同组别 Alpha 多样性分析中的 Shannon 曲线和多样性指数曲线变化 由 Shannon 指数曲线图 3 显示测序量足够多且当前测序量可以反映样品中绝大多数的微生物物种信息。

与正常组比较,模型组 Shannon 指数差异无统计学意义;与模型组比较, JQHP 中、高剂量组升高 ($P<0.05, P<0.01$);与 JQHP 中剂量组比较,其他用药组 Shannon 指数明显降低 ($P<0.05, P<0.01$)。模型组的物种多样性及丰度显著下降, JQHP 中、高剂量组干预后物种的多样性较模型组和正常组均增高,其中 JQHP 中剂量组在各用药组中多样性和丰度增高最具统计学差异。见图 3,表 2。

3.4.2 高脂饮食大鼠不同组别主成分多样性分析 (PCA) 相同颜色的点来自同一个分组,两点之间距离越近表明两者的群落构成差异越小。结果显示,正常组与其他组的距离较远,关系不密切。模型组与立普妥组,血脂康组, JQHP 中、高剂量组距离较远,说明经过药物干预后,群落物种的构成与模型组比较有明显的变化。见图 4。

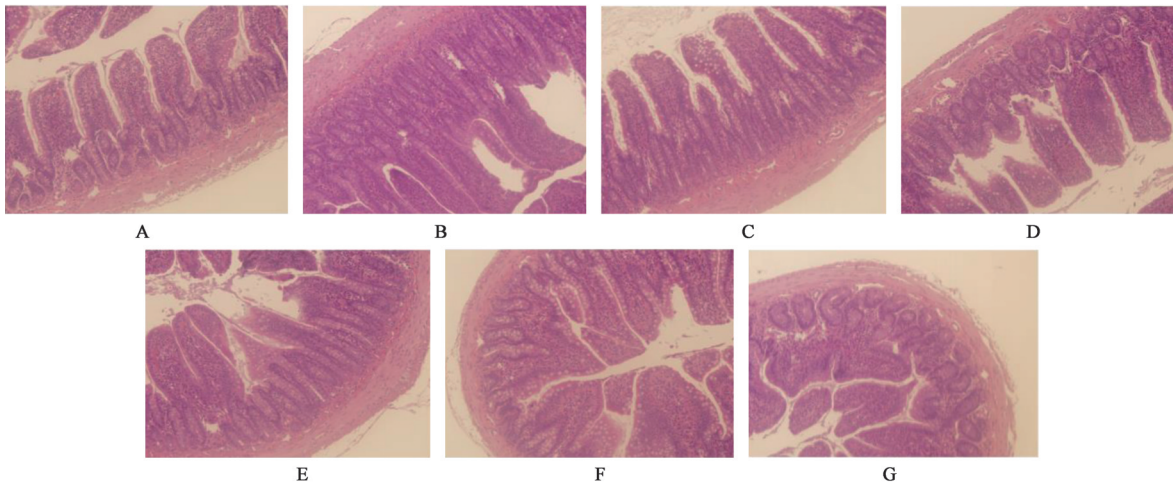


图2 JQHP对大鼠回肠黏膜病理学变化的影响(HE, ×200)

Fig. 2 Effect of JQHP on changes of ileal mucosa in different groups of high-fat diet rats (HE, ×200)

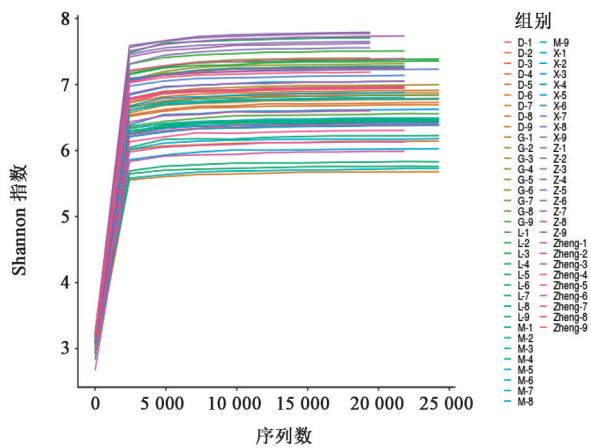


图3 Shannon指数曲线

Fig. 3 Shannon exponential curve

表2 JQHP对大鼠肠道菌群Shannon变化的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 2 Effect of JQHP on changes of Shannon in intestinal flora of rats with high fat diet ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Shannon指数
正常		6.66±0.49
模型		6.42±0.32
血脂康	0.1	6.78±0.44 ⁶⁾
立普妥	0.002	6.83±0.76 ⁶⁾
JQHP	0.4	6.68±0.48 ⁶⁾
	0.8	7.49±0.32 ⁴⁾
	1.6	6.95±0.33 ^{3, 5)}

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⁾ $P<0.01$;与JQHP中剂量组比较⁵⁾ $P<0.05$,⁶⁾ $P<0.01$ (表3同)。

3.4.3 高脂饮食大鼠肠道菌群LDA差异分析 使用非参数因子克鲁斯卡尔-沃利斯秩和检验检测具有显著丰度差异特征,并找到与丰度有显著性差异的类群。与正常组比较,模型组拟杆菌纲,瘤胃

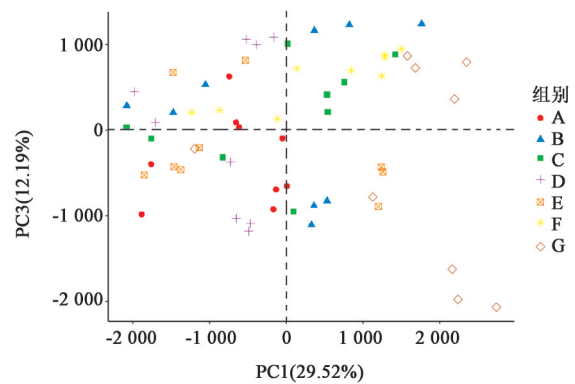


图4 主成分多样性分析

Fig. 4 Principal component analysis

球菌科,拟杆菌 S24-7,瘤胃球菌 UCG-005 下降 ($P<0.01$);脱硫弧菌目,丹毒丝菌目,毛螺菌科升高 ($P<0.05, P<0.01$)。与模型组比较, JQHP 中剂量组的拟杆菌纲,瘤胃球菌科,拟杆菌 S24-7,瘤胃球菌 UCG-005 升高 ($P<0.05, P<0.01$),丹毒丝菌目下降 ($P<0.01$)。拟杆菌纲中 JQHP 中剂量组明显高于其他用药组 ($P<0.05, P<0.01$)。与模型组比较,血脂康组、立普妥组中丹毒丝菌目明显降低 ($P<0.05, P<0.01$), JQHP 中剂量组低于 JQHP 低和高剂量组 ($P<0.05$)。瘤胃球菌科中 JQHP 中剂量组高于 JQHP 低剂量组 ($P<0.01$)。毛螺菌科中 JQHP 中剂量组低于立普妥,血脂康, JQHP 低剂量组 ($P<0.05, P<0.01$)。拟杆菌 S24-7,瘤胃球菌 UCG-005 中 JQHP 中剂量组高于其他用药组 ($P<0.05, P<0.01$)。见表3。

4 讨论

人体的消化道中定植有大量的肠道微生物,被称为“第二基因组”。正常情况下,肠道菌群与宿主之间相互依存、相互限制,以求达到共生共存的平衡状态。长期的血脂异常会导致过多的脂质在血

表 3 JQHP 对大鼠差异表达肠道菌群变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 3 Changes of several differentially expressed intestinal flora in rats with high-fat diet ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	拟杆菌纲	脱硫弧菌目	丹毒丝菌目	瘤胃球菌科	毛螺菌科	拟杆菌 S24-7	瘤胃球菌 UCG-005
正常		0.26±0.03	0.00±0.00	0.03±0.01	0.21±0.01	0.19±0.03	0.18±0.02	0.07±0.01
模型		0.07±0.01 ²⁾	0.03±0.01 ²⁾	0.11±0.02 ²⁾	0.10±0.01 ²⁾	0.36±0.05 ¹⁾	0.04±0.01 ²⁾	0.02±0.00 ²⁾
血脂康	0.1	0.05±0.06 ⁶⁾	0.04±0.01	0.05±0.01 ⁴⁾	0.17±0.02 ³⁾	0.44±0.02 ⁶⁾	0.03±0.00 ⁶⁾	0.04±0.01 ^{3,6)}
立普妥	0.002	0.06±0.01 ⁶⁾	0.03±0.01	0.06±0.00 ³⁾	0.17±0.04	0.44±0.03 ⁵⁾	0.03±0.00 ⁶⁾	0.06±0.02 ³⁾
JQHP	0.4	0.05±0.00 ⁶⁾	0.04±0.01	0.10±0.01 ⁵⁾	0.12±0.02 ⁶⁾	0.43±0.02 ⁵⁾	0.02±0.00 ⁶⁾	0.04±0.01 ⁶⁾
	0.8	0.13±0.02 ⁴⁾	0.04±0.00	0.04±0.01 ⁴⁾	0.24±0.03 ⁴⁾	0.36±0.01	0.07±0.01 ³⁾	0.11±0.02 ⁴⁾
	1.6	0.08±0.01 ⁵⁾	0.01±0.00	0.10±0.02 ⁵⁾	0.20±0.04 ³⁾	0.33±0.04	0.05±0.01	0.10±0.03 ⁴⁾

管壁上沉积引起动脉粥样硬化进而增加心脑血管等疾病的病死率。因此防治高脂血症对延长寿命、改善生活质量具有重要意义。目前中西医在治疗血脂异常各有利弊,西药会出现肝功能异常、横纹肌溶解等不良反应,而中药可根据不同的人群进行辨证论治,因此应发挥中医药的优势。JQHP 由越鞠丸和二陈丸加减化裁而成,二陈汤燥湿化痰、理气和中,越鞠丸解六郁,加焦山楂以活血散瘀,砂仁以燥湿醒胃。全方共奏解郁、祛痰、化浊的功效。本实验采用观察高脂饮食大鼠肠道菌群和肝脏、回肠黏膜病理切片的方法,探究其对肠道微生物在肠-肝轴机制中的影响。

4.1 JQHP 通过调节与炎症反应相关的肠道菌群从而改善肝、肠靶器官的炎症状态 肠道菌群参与机体的脂质代谢表现在影响短链脂肪酸生成^[12-13],参与炎症反应^[14]等方面。短链脂肪酸能够维持肠道微生物群落稳态、肠屏障功能^[15]。本实验显示 JQHP 对肝脏脂肪样变和炎性细胞浸润有缓解作用,同时还可恢复回肠黏膜屏障、改善肠道的炎症状态,且中剂量组疗效最显著。拟杆菌 S24-7 和瘤胃球菌科均属于短链脂肪酸丁酸盐的产生菌,本实验发现拟杆菌 S24-7 模型组显著低于正常组, JQHP 中剂量组高于模型组;瘤胃球菌科模型组显著低于正常组, JQHP 中剂量组显著高于模型组;瘤胃球菌 UCG-005 模型组显著低于正常组,而经药物干预后瘤胃球菌 UCG-005 提高,且 JQHP 中剂量组高于其他用药组。有研究表明,高脂饮食会导致丹毒丝菌增加,拟杆菌减少^[16],丹毒丝菌科是一种机会致病菌,与高脂饮食和肥胖相关^[17],拟杆菌目能够减少白细胞介素-6(IL-6)表达,减低促炎活性^[18]。本实验显示在拟杆菌纲中模型组显著低于正常组, JQHP 中剂量组显著高于模型组;丹毒丝菌目模型组显著高于正常组, JQHP 中剂量组、血脂康组、立普妥组

低于模型组。研究表明毛螺菌科在高脂饲料喂养的小鼠中丰度增加,与代谢紊乱、慢性炎症性疾病的发展相关^[19],本实验显示毛螺菌科在模型组高于正常组。有研究认为高脂饮食所致肠道中产丁酸细菌减少,进而血液中具有抗炎等作用的丁酸水平降低,同时肠道菌群里产丁酸的细菌还可以恢复肠道黏膜,这与肥胖、代谢性疾病均相关^[20]。本实验与上述研究相一致, JQHP 可能是通过调节与炎症相关的肠道菌群而恢复肠肝轴平衡。

4.2 JQHP 改善肠道菌群丰度及多样性 研究表明低的微生物丰度者患代谢性疾病的风险更高^[21]。正常组与模型组的肠道菌群结构发生了明显差异,根据 Shannon 和 PCA 分析可知,高脂饮食诱使大鼠肠道菌群的物种多样性及丰度显著下降,经各药物组干预后物种的多样性较模型组均增高。JQHP 的摄入缓解了鼠肠道菌群失调,具体体现为明显提高物种的多样性和丰度,其中 JQHP 中剂量组均一度高,丰度强,多样性大,肠道菌群的生态环境得以改善,其抵抗疾病的能力越强。因此 JQHP 可以改变肠道菌群的丰度、多样性和功能类群等靶标,改善肠道菌群生态环境。

4.3 从拟杆菌属分析 JQHP 对肠-肝轴动态平衡的影响 短链脂肪酸其受体在激活后能促进脂肪细胞的分化,影响脂质沉积和体质量情况^[22-23]。拟杆菌属为高脂血症与非高脂血症间的关键菌群^[24]。本实验认为拟杆菌会抵抗炎症反应短链脂肪酸可以修复肠道黏膜组织,但一些研究表明肠道中的拟杆菌可抑制小鼠体内禁食诱导脂肪细胞因子,促进脂质沉积,增加高脂血症等疾病的发生率^[25-26]。本实验显示各用药组可明显调节高脂血症大鼠血脂水平,TC, TG 均可见显著降低,另外 JQHP 中剂量组显著降低 LDL-C 水平, JQHP 高剂量组及血脂康组可提高 HDL-C 水平。因此课题组考虑肠道菌群比

例的动态平衡是维持肠道微生物稳态的关键, JQHP中剂量组疗效显著, 是以恢复阴平阳秘为立法基础去恢复肠-肝轴平衡, 调整肠道物种丰度和多样性, 恢复正常肠道微生态环境, 从而达到改善器官状态, 调节血脂水平的效果。

综上所述, 本实验可见高脂饮食使大鼠肠道菌群比例失衡, 模型组菌群多样性、丰度下降, 血脂代谢失调。回肠结构是维持肠黏膜屏障的结构基础, 发现模型组回肠黏膜 HE 染色可见生物屏障受损、炎性浸润。肠屏障受损后, 细菌移位产生的内毒素和脂多糖等经肝门静脉进入肝脏, 激活肝脏库普弗细胞等释放炎症因子, 造成器官的损伤, 本实验发现模型组肝脏 HE 染色可见肝脏脂肪样变和炎症细胞的浸润, 造成肝脏的损害。脂多糖与致病菌同时又加重肠道的炎性, 形成恶性循环。模型组的肠道微生物群与正常组相比发生了变化, 丹毒丝菌科、毛螺菌科等可以加重炎性反应相关的微生物数量显著增加, 拟杆菌目等可以降低炎性反应相关的微生物群显著下降, 而 JQHP 可以逆转这些变化, 同时 JQHP 组增加了与产短链脂肪酸相关的拟杆菌 S24-7, 瘤胃球菌科的含量。JQHP 通过上调产短链脂肪酸类和减轻炎性反应的菌种含量, 下调增加炎性反应的菌种含量, 短链脂肪酸来修复肠道黏膜、一些菌种来改善肝肠的炎性反应, 从而促进肠黏膜屏障修复、维持肠上皮完整性、减轻肝脏细胞和回肠黏膜细胞的炎性状态来恢复高脂饮食大鼠的肠-肝轴平衡。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 郑礼胜, 邵文, 兰新新, 等. 基于肠道菌群新靶点的中药防治糖尿病研究进展[J]. 药物评价研究, 2017, 40(8):1173-1181.
- [2] CHEN F, WEN Q, JIANG J, et al. Could the gut microbiota reconcile the oral bioavailability conundrum of traditional herbs? [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 179:253-264.
- [3] MARSHALL J C. The gut as a Potential trigger of exercise-induced inflammatory responses [J]. Can J Physiol Pharmacol, 1998, 76(5):479-484.
- [4] 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
- [5] PEREIRA D I, MCCARTNEY A L, GIBSON G R. An *in vitro* study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and

determination of its cholesterol-lowering properties [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(8):4743-4752.

- [6] 钟春燕. 菌群及巨噬细胞脂质分解在血脂调节中的作用与机制[D]. 重庆:第三军医大学, 2016.
- [7] YATSUNENKO T, REY F E, MANARY M J, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography[J]. Nature, 2012, 486(7402):222-227.
- [8] TALUKDAR S, OLEFSKY J M, OSBORN O. Targeting GPR120 and other fatty acid-sensing GPCRs ameliorates insulin resistance and inflammatory diseases [J]. Trends Pharmacol Sci, 2011, 32(9):543-550.
- [9] RESTA S C. Effects of probiotics and commensals on intestinal epithelial physiology: implications for nutrient handling [J]. J Physiol, 2009, 587(Pt 17):4169-4174.
- [10] 赵媛媛, 覃骊兰, 郝二伟. 高脂血症动物模型研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(18):215-221.
- [11] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2006:882-887.
- [12] RÍOS-COVIÁN D, RUAS-MADIEDO P, MARGOLLES A, et al. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health [J]. Front Microbiol, 2016, 7:185.
- [13] CANFORA E E, JOCKEN J W, BLAAK E E. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity [J]. Nat Rev Endocrinol, 2015, 11(10):577-591.
- [14] CAESAR R, TREMAROLI V, KOVATCHEVA-DATCHARY P, et al. Crosstalk between gut microbiota and dietary lipids aggravates WAT inflammation through TLR signaling [J]. Cell Metab, 2015, 22(4):658-668.
- [15] HATAYAMA H, IWASHITA J, KUWAJIMA A, et al. The short chain fatty acid, butyrate, stimulates MUC2 mucin Production in the human colon cancer cell line, LS174T [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 356(3):599-603.
- [16] MAGNUSSON K R, HAUCK L, JEFFREY B M, et al. Relationships between diet-related changes in the gut microbiome and cognitive flexibility [J]. Neuroscience, 2015, 300:128-140.
- [17] CHEN G, XIE M, DAI Z, et al. Kudingcha and fuzhuan brick tea prevent obesity and modulate gut microbiota in high-fat diet fed mice [J]. Mol Nutr Food Res, 2018, 62(6):e1700485.
- [18] QI C, LI Y, YU R Q, et al. ComPosition and immunostimulatory properties of extracellular DNA from mouse gut flora [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(44):7830-7839.

- [19] ZENG H, ISHAQ S L, ZHAO F Q, et al. Colonic inflammation accompanies an increase of beta-catenin signaling and *Lachnospiraceae/Streptococcaceae* bacteria in the hind gut of high-fat diet-fed mice[J]. *J Nutr Biochem*, 2016, 35:30-36.
- [20] JAKOBSDOTTIR G, JÄDERT C, HOLM L, et al. Propionic and butyric acids, formed in the caecum of rats fed highly fermentable dietary fibre, are reflected in portal and aorticserum[J]. *Brit J Nutr*, 2013, 110(9):1565-1572.
- [21] COTILLARD A, KENNEDY S P, KONG L C, et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness[J]. *Nature*, 2013, 500(7464):585-588.
- [22] KIMURA I, INOUE D, MAEDA T, et al. Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(19):8030-8035.
- [23] KAMEYAMA K, ITOH K. Intestinal colonization by a *Lachnospiraceae* bacterium contributes to the development of diabetes in obese mice[J]. *Microbes Environ*, 2014, 29(4):427-430.
- [24] 牟菲, 赵娟娟, 纪泽敏, 等. 基于16S rDNA高通量测序技术挖掘影响高脂血症的核心菌群[J]. *中国药物与临床*, 2020, 20(5):701-704.
- [25] CANI P D, BIBILONI R, KNAUF C, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice[J]. *Diabetes*, 2008, 57(6):1470-1481.
- [26] BÄCKHED F, DING H, WANG T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(44):15718-15723.

[责任编辑 张丰丰]

· 书讯 ·

护士层级管理在临床护理管理工作中的应用 ——评《护理技术操作程序与质量管理标准》

护理人员的专业水平和技能直接影响到患者的康复及恢复效率。《护理技术操作程序与质量管理标准》是根据卫生部新护理技术操作程序和质量标准及指南,由冯志仙,黄丽华等编写。本书对护理技术操作和护理器具的使用进行了流程优化和技术更新,对质量管理标准进行了改革和创新。结合护士层级管理进一步推动临床管理的工作效率。

《护理技术操作程序与质量管理标准》作者冯志仙,浙江大学出版社2013年10月出版。全书共分为9部分,包含53个项目的护理技术操作与质量管理标准。符合临床应用,具有一定的科学性,实用性较强。本书在上一版的基础上增加了12个项目,并对前一版各个项目的技术操作规范进行了修正和完善,对质量管理标准作了改进和深化。对各个项目补充了评估、并发症的预防和处理、注意事项等内容,使得在临床应用时对每一项目的操作更易掌握和控制。附录部分增加了常用评估工具内容。

护士层级管理是在常规护理管理的基础上将护理人员分为两组,由1名护士长和2名组长带队,采用竞争比分的方式进行护理。护理过程中,依据《护理技术操作程序与质量管理标准》,结合患者的实际情况,将护理内容及时上报给组长,对一些护理过程中出现的特殊问题进行互相交流、研讨,进而制定出具有针对性的方案,制定出的方案需要由护士长进行审核,通过之后才能够进行落实。两组护理人员采用轮班制,护士长可以根据测试来进行分组,对护理人员的能力水平进行随时考核,根据具体考核结果每月进行定期的人员调换,护士长需要根据组长总结汇报上的内容进行补充和完善,制定出对护理人员的定期培训方案。护理人员的表现优异则可以提升为代理组长,这样能够有效提升护理人员的工作主动性和积极性。

根据《护理技术操作程序与质量管理标准》制定出护理人员的观察指标,①护理人员的工作质量:在进行护理干预后,可由同一小组的两组护士对护理工作质量进行相互评价,评价项目应当包含基础护理、护理安全、病房管理及护理文书4个项目;②护理的满意程度:对护理人员提供服务的患者中进行一定数量的对象随机抽取,采用调查问卷的形式来调查护理满意程度,满意度可以分为满意、基本满意及不满意3个级别,满意程度汇总也可以包含满意率及基本满意率等;③护理风险的发生率:对比基础护理及层级护理的风险发生率,其中也应当包含护理差错及医护纠纷等。

护理层级管理是医疗改革体制发展及医疗技术发展的重要体现,医疗模式的逐渐专业化与复杂化让临床护士必须从单一的护理工作转向更加高端的专业化、多元化,才能进一步满足社会对临床护理的具体需求。临床护理中的护理层级管理模式充分考虑护理人员的学历、资历、业务能力及技术水平等各项要素,有效优化医疗机构的资源配置,充分发挥护理人员的个人能力,积极调动护理人员的工作主动性。各个层级的护士充分为患者提供更加优质、高效、专业的护理服务,发挥专业实践的自律性与自主性,打破学科之间的壁垒,采用多学科团队的合作,提升护理工作质量。新时代的护理人员不仅能够护理患者,还需要有效支持主治医师对患者进行辅助治疗,通过层级管理进一步体现出护理人员在患者抢救过程中的重要性。

该书根据临床实际护理工作的具体情况进行操作项目和具体程序的编写,通过阅读本书结合实际层级管理工作,有效提升护士的工作积极性,让护士在充分发挥自身专业能力的同时进一步提升专业水平。通过学习本书,将护理工作更加专业化,为患者提供更加优质的服务。在护理过程中不仅让患者满意,也能够积极配合主治医生对患者进行及时的治疗,确保患者在住院期间降低护理风险,提升治愈率和出院率。本书适合相关专业学生作为辅助教材使用,也可以作为在职护理人员作为提升能力水平再教育的参考资料使用。

(作者徐海蓉,李巧,丰都县人民医院,重庆 丰都 408000)