

# 基于16S rRNA测序研究葛根芩连汤对菌群失调性腹泻大鼠肠道菌群结构的影响

张庚鑫, 杜海洋, 王平, 杨光勇, 涂小华, 田维毅, 王文佳, 何光志\*  
(贵州中医药大学基础医学院, 贵阳 550025)

**[摘要]** 目的: 采用16S rRNA技术研究葛根芩连汤对菌群失调性腹泻大鼠肠道菌群结构的影响。方法: 将60只健康SD大鼠随机分为6组, 分别为正常组、模型组、葛根芩连汤高、中、低剂量组、丽珠肠乐组, 每组10只。除正常组外, 每日按头孢拉定 $178.6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 硫酸庆大霉素 $31.25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 混合抗生素进行灌胃造模, 造模成功后, 葛根芩连汤高、中、低剂量组灌胃葛根芩连汤( $7.02, 3.51, 1.755 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 丽珠肠乐组按 $0.125 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃, 正常组与模型组给予无菌蒸馏水灌胃, 体积分数均为 $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 连续给药7 d, 将大鼠麻醉后取大鼠结肠内容物, 提取粪便DNA后进行16S rRNA高通量测序并分析其结果。结果: 葛根芩连汤明显调节菌群失调性腹泻模型大鼠的物种数量及Alpha与Beta多样性, 提高菌群生物丰富度指数与多样性指数, 正向调节菌群失调性腹泻模型大鼠的3种差异菌门(厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门)与14种差异菌属(拟杆菌属、狄氏副拟杆菌属、布劳特氏菌属等)。结论: 葛根芩连汤对菌群失调性腹泻模型大鼠肠道菌群有调节作用, 揭示了肠道菌群与菌群失调性腹泻之间的生理病理机制。

**[关键词]** 16S rRNA; 葛根芩连汤; 肠道菌群; 菌群结构; 菌群失调性腹泻

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5; R289; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)11-0019-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20211001

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210330.1321.001.html>

**[网络出版日期]** 2021-3-31 8:39

## Effect of Gegen Qinliantang on Structure of Intestinal Flora in Dysbacterial Diarrhea Rats Based on 16S rRNA Sequencing

ZHANG Geng-xin, DU Hai-yang, WANG Ping, YANG Guang-yong, TU Xiao-hua, TIAN Wei-yi,  
WANG Wen-jia, HE Guang-zhi\*

(School of Basic Medicine, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of Gegen Qinliantang (GQT) on the structure of intestinal flora in dysbacterial diarrhea rats by 16S rRNA sequencing. **Method:** Sixty healthy SD rats were randomly and equally divided into a control group, a model group, high-, medium-, and low-dose GQT groups, and a Bifidobigen group. The rat model was induced in the five groups except the control group by administration of mixed antibiotics ( $178.6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  cefradine and  $31.25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  gentamicin sulfate) according to the dose. Drug intervention was carried out in each group ( $7.02, 3.51, \text{ and } 1.755 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  GQT for the high-, medium-, and low-dose GQT groups,  $0.125 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  bifidobacterium capsules for the Bifidobigen group, and sterile distilled water for the control and model groups) with a volume of  $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$  for seven days. Colon contents of rats were obtained under anesthesia. The extracted fecal DNA underwent 16S rRNA high-throughput sequencing and the

**[收稿日期]** 20201230(013)

**[基金项目]** 2018年度学术新苗项目(黔科合平台人才[2018]5766号-16);国家自然科学基金地区科学基金项目(82060796);贵州省科学技术基金项目(黔科合基础[2020]1Y392);贵州省教育厅创新群体重大项目(黔教合KY字[2016]036);贵州省科技创新人才团队建设专项(黔科合平台人才[2020]5010);贵州省发展和改革委员会工程研究中心建设项目[黔发改高技(2020)896号]

**[第一作者]** 张庚鑫, 在读硕士, 从事中医学基础的研究, E-mail: 1021918590@qq.com

**[通信作者]** \*何光志, 教授, 硕士生导师, 从事中西医结合基础研究, E-mail: 392724549@qq.com

results were analyzed. **Result:** GQT was proved capable of adjusting the species number and Alpha and Beta diversity, improving the biological richness and diversity of the flora, and positively regulating three differential phyla (Firmicutes, Proteobacteria, and Bacteroidetes) and 14 differential genera (*Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Blautia*, etc.) in rat model of dysbacterial diarrhea. **Conclusion:** The present study confirmed the regulatory effect of GQT on intestinal flora of dysbacterial diarrhea rats, and revealed the physiological and pathological mechanism between intestinal flora and dysbacterial diarrhea.

[**Key words**] 16S rRNA; Gegen Qinliantang; intestinal flora; flora structure; dysbacterial diarrhea

目前临床上抗菌药物应用越来越广泛,使用抗菌剂,无论是治疗还是预防,都会破坏宿主和正常微生物区系之间的生态平衡<sup>[1]</sup>,最常见的肠道菌群失调会导致腹泻。目前治疗菌群失调性腹泻药物比较单一且疗效较为局限。

肠道菌群作为肠道内的正常微生物群直接或间接地参与了人体的免疫调节、能量供应、营养吸收、消化、脂肪代谢、预防疾病等多个方面<sup>[2-3]</sup>。正常情况下,肠道菌群与人体及外界环境间保持着一种相对平衡的状态,以维持机体健康,一旦这种平衡被打破,肠道菌群失调,便会引起疾病的产生<sup>[4]</sup>。

中医学在治疗腹泻方面的疗效突出越来越备受青睐,其诊疗特点为“整体观念、辨证论治”,腹泻在中医理论中统归于“泄泻”范畴,其病因有外感、内伤两类,病机为脾胃运化失职。葛根芩连汤出自医圣张仲景《伤寒杂病论》,为诸多经方中的一首,全方由葛根、黄芩、黄连和炙甘草4味中药配伍而成,有解表清里,升清止利之功效,主要用于治疗“伤寒外证未解,邪热内陷,协热下利”的代表方剂,对细菌性痢疾及小儿病毒性腹泻等有良好疗效<sup>[5-6]</sup>。

目前基于肠道菌群探讨葛根芩连汤治疗菌群失调性的相关研究鲜有报道,故本研究以传统经典方药葛根芩连汤为研究对象,采用高通量测序16S rRNA技术研究其对抗生素混合液制备的菌群失调性腹泻模型大鼠的肠道微生态整体的影响,以期从微生区系角度阐释葛根芩连汤治疗菌群失调性腹泻的作用机制,为开发菌群失调腹泻治疗药物提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级SD大鼠60只,雌雄各半,体质量(220±20)g,购自长沙天勤生物技术有限公司,合格证号SCXK(湘)2019-0014,所有实验大鼠的使用和喂养严格遵照中国实验动物伦理协会所规定的有关动物伦理福利条款进行。

**1.2 试剂** 硫酸庆大霉素(西安杨森制药有限公司,批号H20010309);头孢拉定(山东鲁抗医药股份

有限公司,批号190426);丽珠肠乐(丽珠医药集团股份有限公司,批号20190309);葛根(批号201201);黄芩(批号200701);黄连(批号200301);炙甘草(批号201202)(均购自同仁堂贵阳分店);水合氯醛(天津科密欧化学试剂有限公司,批号Q/12HB 4218-2017);粪便基因组DNA提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,批号U8621]。

**1.3 设备** SCLOGES小型离心机(上海珂淮仪器有限公司);NanoDrop2000型超微量分光光度计, Thermo Micro 21R型冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific公司);Illumina MiSeq测序平台(美国 Illumina公司)。

## 2 方法

**2.1 葛根芩连汤的制备** 葛根15g,黄芩9g,黄连9g,炙甘草6g,将各味混合药材饮片加6倍量纯水浸泡30min,武火煮沸后改文火继续煎煮30min,煎煮2次<sup>[7]</sup>,合并药液后过滤,滤液浓缩至生药质量浓度 $1\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,4℃条件下保存备用。

**2.2 菌群失调性腹泻大鼠模型的制备** 参照文献[8]并加以改良进行菌群失调性腹泻大鼠模型的制备。将60只健康SD大鼠适应性喂养1周后,随机分成6组,分别为正常组、模型组、葛根芩连汤高、中、低剂量组、丽珠肠乐组,每组10只。除正常组外,其余各组SD大鼠每日按剂量进行头孢拉定 $178.6\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和硫酸庆大霉素 $31.25\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 混合抗生素灌胃进行造模(其剂量按《实验动物学》剂量换算表),1次/d,连续7d,每日上午9:00~10:00完成造模。造模7d后进行评估,模型成功后给予葛根芩连汤煎剂灌胃,用腹泻粪便等级评分及肠黏膜损伤评分标准检测造模是否成功,根据石坤<sup>[9]</sup>对粪便腹泻评分标准进行评分并统计,根据邢茜<sup>[10]</sup>对肠黏膜损伤评分标准进行评分。

**2.3 灌胃给药干预** 葛根芩连汤高、中、低剂量组每日按人体临床上限的2,1,0.5倍剂量折算后灌胃给予实验大鼠葛根芩连汤(按生药量计算分别为 $7.02, 3.51, 1.755\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),丽珠肠乐组按 $0.125\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$

给予双歧杆菌活菌灌胃,正常组与模型组给予蒸馏水灌胃,给药体积均为 10 mL·kg<sup>-1</sup>,连续给药 7 d。

**2.4 样本的采集** 在末次给药 6 h 后,用 10% 水合氯醛进行大鼠麻醉,取大鼠结肠内容物于无菌离心管储存,迅速置入液氮中,结束后取出样本-80 °C 超低温冰箱保存。

**2.5 菌群高通量测序** 从每组中随机选出 5 个样本进行粪便 DNA 的抽取,进行肠道菌群多样性检测,引物合成及 DNA 测序委托杭州联川生物技术股份有限公司完成。采用 Illumina MiSeq 测序平台,上游引物 5'-CCTACGGGNGGCWGCCAG-3',下游引物 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3',经过两端数据连接与去除嵌合体等步骤之后,利用高灵敏度定量及文库试剂盒对文库信息 2100 作质检,TruSeq Nano DNALT 对样品试剂盒进行建库,运用荧光定量分析法对 16S rRNA V4 区有效序列进行 MiSeq 的 2×300 bp 双端测序。

**2.6 测序数据处理** 测序结果经两端合并后,使用 Vsearch(2.14.1)对 Tags 进行处理切除引物及去冗余<sup>[11]</sup>。数据运用 Usearch10 的 unoise3 进行 Amplicon Sequence Variants (ASV) 非聚类去噪<sup>[12]</sup>,

生成操作分类单元(OTU),基于 Silva 数据库去除嵌合体,生成 OTU 表,基于 rdp 数据库进行物种注释(置信值 >0.6)。采用 Alpha, Beta 和 Linear discriminant analysis Effect Size (LEfSe)方法对肠道菌群进行多样性及物种分类的差异性进行分析<sup>[13]</sup>;同时运用 Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States 2 (PICRUST2)进行功能预测分析<sup>[14]</sup>。

**2.7 统计学分析** 本次实验数据采用 SPSS 25.0 进行统计学分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验及非参数检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 葛根芩连汤对 SD 大鼠腹泻粪便等级评分的影响** 造模前 SD 大鼠精神良好,粪便正常,但造模后第 3 天逐渐出现精神萎靡、眯眼、倦怠乏力,食欲减退,毛色污秽无光泽,身抖畏寒。与造模前 SD 大鼠粪便腹泻评分比较,造模后出现明显稀便(*P*<0.05)。与模型组比较,葛根芩连汤各组给药治疗 3 d 后大鼠粪便状态出现明显改善(*P*<0.05),且精神状态逐渐趋于正常;丽珠肠乐组给药 3 d 大鼠粪便无明显改善,软便持续至 7 d 消失。见表 1。

表 1 葛根芩连汤对 SD 大鼠腹泻粪便等级评分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 1 Effect of Gegen Qinliantang(GQT) on diarrhea fecal grade score of SD rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	造模后 3 d	造模后 7 d	用药后 3 d	用药后 7 d
正常		0	0	0	0
模型		1.13±0.35 <sup>1)</sup>	2.25±0.46 <sup>1)</sup>	1.13±0.35 <sup>1)</sup>	1
丽珠肠乐	0.125	1.13±0.35 <sup>1)</sup>	2.00±0.53 <sup>1)</sup>	0.88±0.35	0
葛根芩连汤	7.02	1.25±0.46 <sup>1)</sup>	2.13±0.35 <sup>1)</sup>	0.75±0.46	0
	3.51	1	2.13±0.64	0.75±0.46	0
	1.755	11.13±0.35 <sup>1)</sup>	2.13±0.35	0	0

注:与正常组比较<sup>1)</sup>*P*<0.05;与模型组比较<sup>2)</sup>*P*<0.05。造模前评分均为 0 分。

**3.2 葛根芩连汤对 SD 大鼠 Chiu 肠黏膜损伤评分的影响** 与正常组比较,模型组肠黏膜损伤有极显著差异(*P*<0.01);与模型组比较,给药组结肠黏膜发生明显改善(*P*<0.05),提示葛根芩连汤及丽珠肠乐从调节菌群方面对肠道黏膜损伤起到修复作用。见表 2。综合 3.1 项和 3.2 项结果,造模前后 SD 大鼠精神、粪便和 Chiu 肠黏膜损伤情况,证实本次实验造模成功。

**3.3 大鼠肠道菌群的 Alpha 多样性分析** 与正常组比较,模型组 SD 大鼠的香农(Shannon)指数明显降低(*P*<0.05);与模型组比较,葛根芩连汤低剂量组肠道菌群的物种多样性明显回调(*P*<0.05);葛根芩连

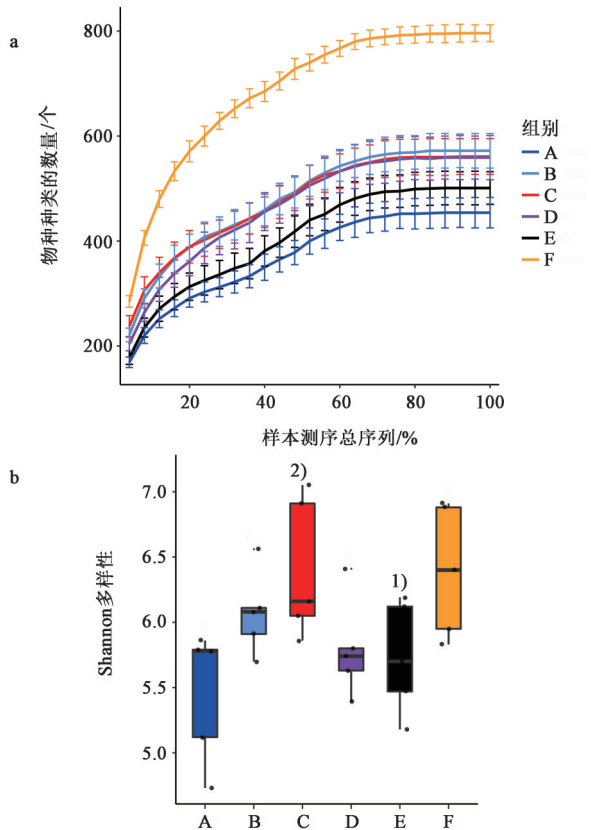
表 2 葛根芩连汤对 SD 大鼠 Chiu 肠黏膜损伤评分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of GQT on intestinal mucosal injury score in SD rats ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	评分/分
正常		1
模型		4.33±0.41 <sup>2)</sup>
丽珠肠乐	0.125	1.67±0.82 <sup>3)</sup>
葛根芩连汤	7.02	2.67±0.41 <sup>3)</sup>
	3.51	2.33±0.82 <sup>3)</sup>
	1.755	1.67±0.82 <sup>3)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>*P*<0.05,<sup>2)</sup>*P*<0.01;与模型组比较<sup>3)</sup>*P*<0.05。

汤高、中剂量组及丽珠肠乐组肠道菌群的物种多样性差异无统计学意义。见图1。



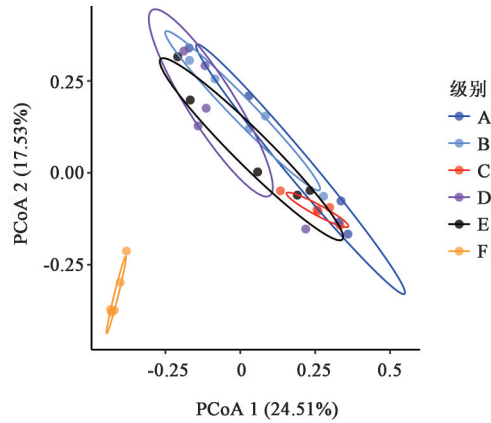
a. 稀释曲线; b. Shannon 多样性; A. 葛根芩连汤高剂量组; B. 葛根芩连汤中剂量组; C. 葛根芩连汤低剂量组; D. 丽珠肠乐组; E. 模型组; F. 正常组; 与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$

图1 葛根芩连汤对菌群失调性腹泻模型肠道菌群Alpha多样性的影响

Fig. 1 Effect of GQT on diversity of intestinal microflora Alpha in a model of bacterial dysregulation diarrhea

**3.4 大鼠菌群结构Beta多样性分析** PCoA结果显示,第一主成分PCoA1可以解释组间24.51%的差异,第二主成分PCoA2可以解释组间17.53%的差异,同时组间相似性分析(ANOSIM)显示 $R=0.54$ , $P=0.001$ 。见图2。

**3.5 肠道菌群结构分析** 本次实验结果显示在门水平上,厚壁菌门在各组中的相对丰度排列依次为丽珠肠乐组(46.10%),葛根芩连汤中剂量组(42.50%),模型组(40.98%),葛根芩连汤高剂量组(37.94%),葛根芩连汤低剂量组(33.86%),正常组(30.92%);拟杆菌门在各组中的相对丰度排列依次为正常组(63.36%),葛根芩连汤中剂量组(57.90%),葛根芩连汤高剂量组(55.48%),模型组(53.00%),葛根芩连汤低剂量组(51.8%),丽珠肠乐组(49.60%);变形菌门在各组中的相对丰度排列依次为葛根芩连汤低剂量组(7.28%),葛根芩连汤高



A. 葛根芩连汤高剂量组; B. 葛根芩连汤中剂量组; C. 葛根芩连汤低剂量组; D. 丽珠肠乐组; E. 模型组; F. 正常组(图3同)

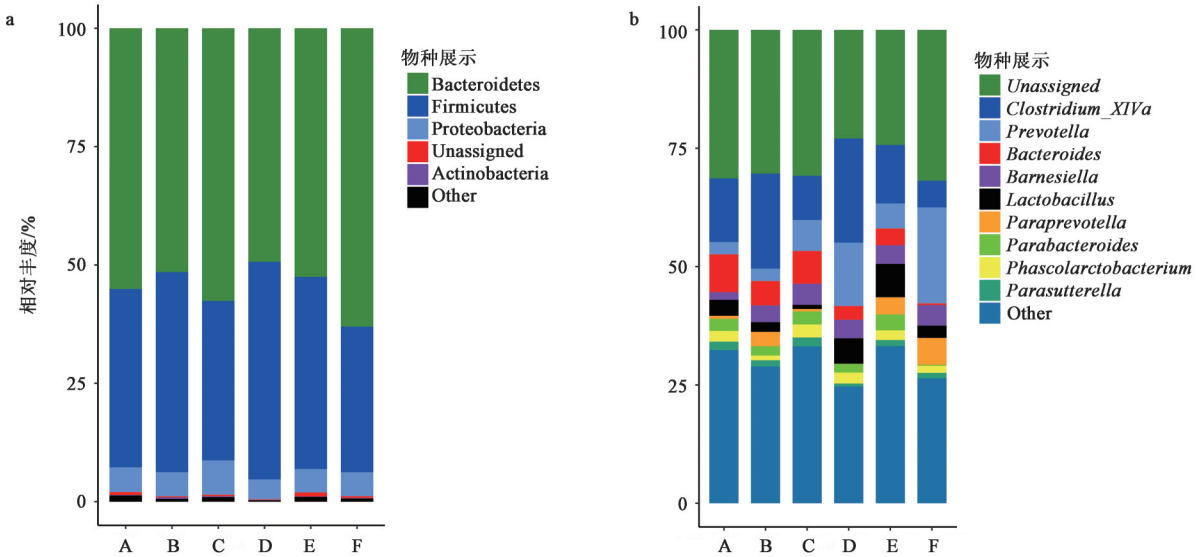
图2 葛根芩连汤对菌群失调性腹泻模型肠道菌群的Beta多样性的影响

Fig. 2 Effect of GQT on Beta diversity of intestinal flora in model of bacterial dysregulated diarrhea

剂量组(5.27%),葛根芩连汤中剂量组(5.11%),正常组(5.09%),模型组(4.99%),丽珠肠乐组(4.186%)。

在属水平上,梭菌属(*Clostridium*)各组中的相对丰度排列依次为丽珠肠乐组(26.502%),葛根芩连汤中剂量组(24.5%),葛根芩连汤高剂量组(16.86%),模型组(16.44%),葛根芩连汤低剂量组(11.656%),正常组(6.72%);普雷沃菌属(*Prevotella*)各组中的相对丰度排列依次为正常组(24.06%),丽珠肠乐组(16.13%),葛根芩连汤低剂量组(8.214%),模型组(7.024),葛根芩连汤高剂量组(3.24),葛根芩连汤中剂量组(3.192);拟杆菌属(*Bacteroides*)在各组中的相对丰度排列依次为葛根芩连汤高剂量组(10.026%),葛根芩连汤低剂量组(8.672%),模型组(4.71%),葛根芩连汤中剂量组(4.34%),丽珠肠乐组(3.49%),正常组(0.42%)。见图3。

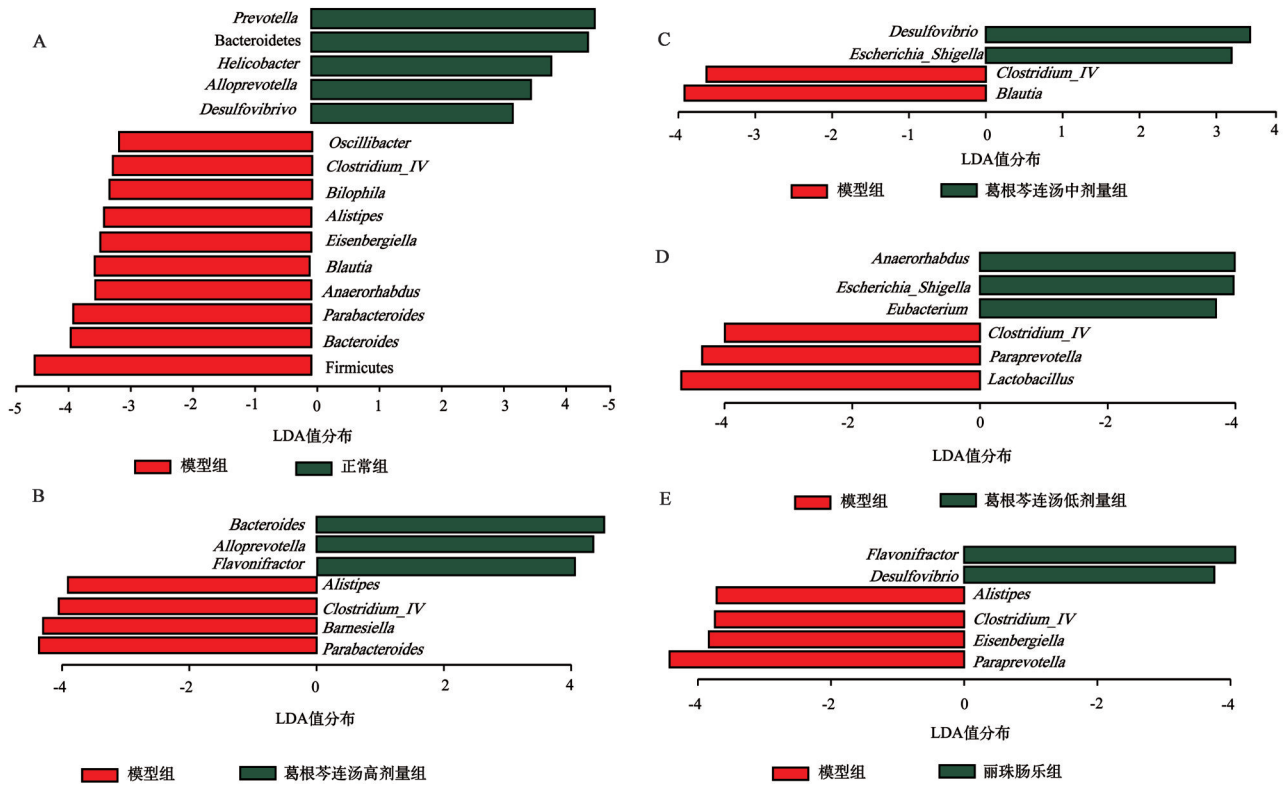
LEfSe分析结果显示,在属水平上,与正常组比较,模型组中*Bacteroides*,狄氏副拟杆菌属(*Parabacteroides*),布劳特氏菌属(*Blautia*),棍状厌氧菌属(*Anaerorhabdus*),艾森伯格氏菌属(*Eisenbergiella*),嗜胆菌属(*Bilophila*),别样杆菌属(*Alistipes*),*Clostridium*和颤杆菌属(*Oscillibacter*)的丰度增加;脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*),拟普雷沃菌属(*Alloprevotella*),螺杆菌属(*Helicobacter*)和普雷沃菌属(*Prevotella*)的丰度减少,见图4A。与模型组比较,葛根芩连汤高剂量组中帕拉普氏菌属(*Paraprevotella*),巴氏杆菌属(*Barnesiella*),



a. 门水平下的物种叠加; b. 属水平下的物种叠加

图 3 葛根芩连汤对菌群失调性腹泻模型肠道菌群物种多样性的影响

Fig. 3 Effect of Gegen Qinliantang on species diversity of intestinal flora in model of bacterial dysregulated diarrhea



A. 正常组与模型组肠道菌群差异; B. 高剂量组与模型组肠道菌群差异; C. 中剂量组与模型组肠道菌群差异; D. 低剂量组与模型组肠道菌群差异; E. 丽珠肠乐组与模型组肠道菌群差异

图 4 LEfSe 分析葛根芩连汤对菌群失调性腹泻模型肠道菌群的影响(LDA SCORE>2)

Fig. 4 Effect of LEfSe analysis on GQT on intestinal flora of bacterial dysregulated diarrhea model (LDA SCORE>2)

*Clostridium* 和 *Alistipes* 的丰度降低; 黄杆菌属 (*Flavonifractor*), *Alloprevotella* 和 *Bacteroides* 的丰度升高, 见图 4B; 中剂量组中 *Clostridium* 和 *Blautia* 的丰度降低; *Desulfovibrio* 和大肠埃希菌志贺菌属

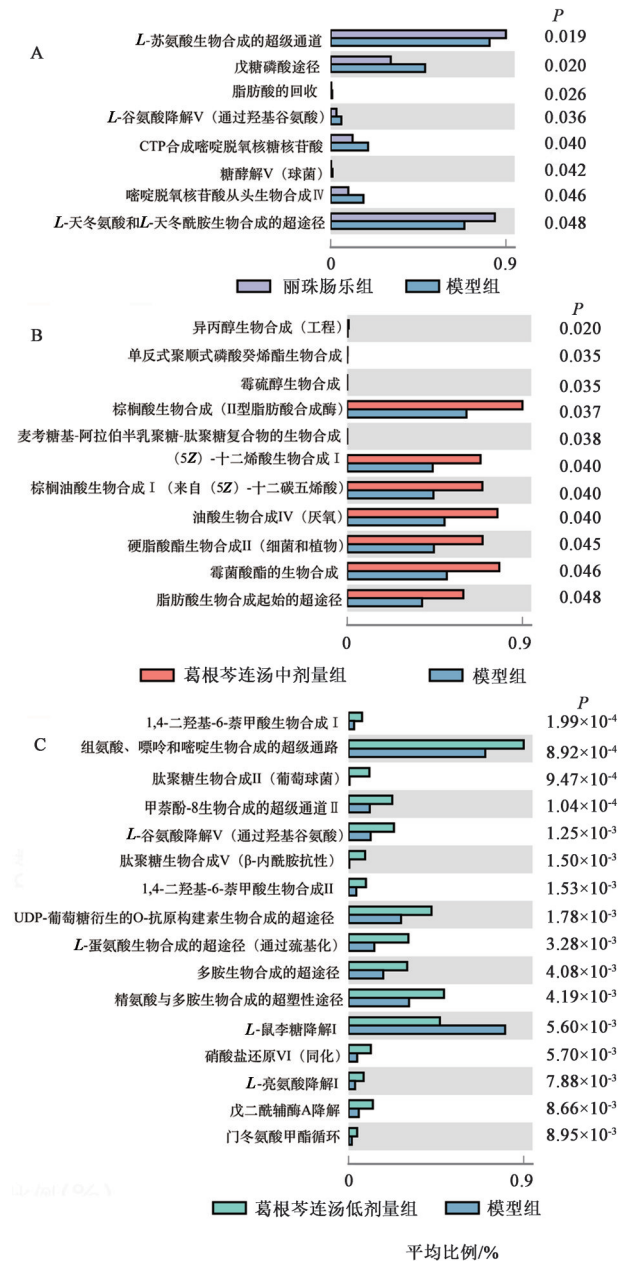
(*Escherichia-Shigella*) 的丰度升高, 见图 4C; 低剂量组降低了乳杆菌属 (*Lactobacillus*), *Paraprevotella* 和 *Clostridium* 的丰度, 升高了优杆菌属 (*Eubacterium*), *Anaerorhabdus* 和 *Escherichia-*

*Shigella* 的丰度, 见图 4D; 丽珠肠乐组中 *Alistipes*, *Clostridium*, *Eisenbergiella* 和 *Paraprevotella* 的丰度降低; *Flavonifractor* 和 *Desulfovibrio* 的丰度升高, 见图 4E。

**3.6 功能预测** 为了确定肠道微生物区系的分类变化是否影响其功能, 本研究通过 Picrust2 对代表性序列进行功能预测。MetaCyc 显示, 与模型组比较, 葛根芩连汤中剂量组中差异代谢通路主要涉及糖的代谢通路有麦考糖基-阿拉伯半乳糖-肽聚糖复合物的生物合成, 脂肪酸的代谢通路有棕榈酸生物合成 (II 型脂肪酸合成酶), (5Z)-十二烯酸生物合成 I, 棕榈油酸生物合成 I (来自 (5Z)-十二碳五烯酸), 油酸生物合成 IV (厌氧), 硬脂酸酯生物合成 II (细菌和植物), 脂肪酸生物合成起始的超途径 (大肠埃希菌); 葛根芩连汤低剂量组中差异代谢通路主要涉及糖的代谢通路有肽聚糖生物合成 II (葡萄球菌), 肽聚糖生物合成 V ( $\beta$ -内酰胺抗性), UDP-葡萄糖衍生的 O-抗原构建素生物合成的超途径, 而 L-鼠李糖降解 I, 氨基酸的代谢通路有组氨酸, 嘌呤和嘧啶生物合成的超级通路, L-谷氨酸降解 V (通过羟基谷氨酸), L-蛋氨酸生物合成的超途径 (通过巯基化), 精氨酸与多胺生物合成的超塑性途径, L-亮氨酸降解 I, 戊二酰辅酶 A 降解和门冬氨酸甲酯循环; 丽珠肠乐组中差异代谢通路主要涉及糖的代谢通路有戊糖磷酸途径, 糖酵解 V (球菌) 和嘧啶脱氧核苷酸从头生物合成 IV, 脂肪酸的代谢通路有脂肪酸的回收, 氨基酸的代谢通路有其 L-苏氨酸生物合成的超级通道, L-天冬氨酸和 L-天冬酰胺生物合成的超途径, L-谷氨酸降解 V (通过羟基谷氨酸); 葛根芩连汤高剂量组中无差异代谢通路。见图 5。

#### 4 讨论

正常肠道菌群具有分解食物和吸收营养, 维持肠道黏膜屏障和促进免疫系统的正常发育等作用。研究发现肠道菌群分布和结构与人类健康和疾病具有密切相关性。抗生素长期大剂量使用会破坏肠道菌群, 导致条件致病菌变为致病菌。当致病菌繁殖一定量时就会出现菌群失调性腹泻。目前, 菌群失调性腹泻尚无特效疗法, 一般采用支持治疗与重建正常菌群。然而, 西医治疗本病强调抗生素灭杀致病菌, 忽视了调整肠道菌群平衡, 而且使用抗生素治疗时会出现毒副作用, 这可能引起新的菌群失调和耐药病原菌株的出现, 甚至可能复发。中医学疗效独特, 能使人类摆脱单纯依靠抗生素杀菌和抑菌的模式。中药复方多以口服为主, 其有效成分



A. 低剂量组与模型组在代谢通路的差异; B. 中剂量组与模型组在代谢通路的差异; C. 丽珠肠乐组与模型组在代谢通路的差异

图 5 功能预测通路平均比例分析

Fig. 5 Analysis of average proportion of functional prediction pathway

与胃肠道菌群相互作用, 大部分药物经肠道吸收代谢后来发挥作用, 故中药对胃肠道菌群的调节相比于西药更具有全面、双向调节的优势, 即在促进益生菌生长的情况下又可抑制有害菌的繁殖<sup>[15-24]</sup>。

由于肠道菌群紊乱在菌群失调性腹泻的发生、进展过程中扮演重要角色。故本研究采用抗生素混合液制备菌群失调性腹泻模型, 为葛根芩连汤治疗菌群失调性腹泻提供理论依据, 为临床应用葛根芩连汤治疗菌群失调性腹泻提供实验支持。现代

药理研究表明葛根芩连汤具有解热抑菌、抗腹泻、减缓推进率、抑制胃肠运动、增强机体免疫功能<sup>[25-29]</sup>。

基于16S rRNA技术的肠道菌群研究,多采用ASVs, Alpha与Beta多样性等指标进行分析与评价。ASVs划分通常以97%的序列相似度作为OTU划分阈值,在某一确定的分类水平进行序列双端合并,可对不同来源的微生物群落样本进行互相比较。Alpha多样性主要反映组内样本的测序深度,以此判断微生物多样性是否具有分类学意义。Beta多样性分析考察不同组别之间群落结构的相似性为主,通过PCoA对菌群结构进行自然分解,并通过对本样本排序,从而观测样本之间的差异。本文研究结果表明葛根芩连汤低剂量组优于丽珠肠乐组,尤其是回调ASVs划分与Alpha多样性的丰富度指数与多样性指数,推断可能是因为中药复方具有多成分、多位点的特性,对菌群失调性腹泻模型机体起到整体的治疗作用<sup>[23]</sup>,但仍需进一步的研究来证实。

运用分类学组成和聚类学分析发现,葛根芩连汤主要影响厚壁菌门、拟杆菌门的数量、变形菌门、放线菌门,其所占比重之和超过总体菌群数量的97%,其中厚壁菌门、拟杆菌门是健康宿主共有的优势菌群<sup>[30]</sup>。厚壁菌门在肠道中能够帮助多糖发酵,其芽孢杆菌属的主要作用是维持动物肠道的健康<sup>[31]</sup>。厚壁菌门在正常组中的相对比例较低,除正常组在各组中的相对比例随灌胃液浓度的变化而变化,变化趋势与灌胃液浓度呈反相关。有研究表明在儿童患者中疾病发病初期,数量却是明显增加的,它可能起到了潜在的保护作用,随着中药的应用厚壁菌门的丰度趋于正常<sup>[32]</sup>,且与本研究结果相符。本实验中葛根芩连汤对菌群失调性腹泻模型大鼠的4种菌门与14种菌属产生回调作用,其中梭状芽孢杆菌属是最常见的抗生素相关性腹泻致病菌属(图3b),而艰难梭菌是抗生素相关性腹泻的主要原因<sup>[33]</sup>。艰难梭菌在微生物区系紊乱后扩张的机制刚被认知。

艰难梭菌在肠道共生菌 *Thetotaomicron* 的存在下,诱导微生物区系发酵最终产物琥珀酸代谢为丁酸。常规小鼠体内的低浓度琥珀酸在抗生素治疗或化学诱导的肠道运动障碍时会短暂升高,艰难梭菌利用这种琥珀酸尖峰在受干扰的肠道中扩张,因此平衡的微生物区系被打破从而出现菌群失调性改变,葛根芩连汤低剂量组对梭状芽孢杆菌属具有

显著的回调作用。已有相关研究报道梭状芽孢杆菌属在结直肠癌的发生中起作用,研究表明梭杆菌属与肿瘤的侵袭、转移呈正相关,葛根芩连汤可降低梭杆菌属的丰度<sup>[34-36]</sup>。本研究结果表明葛根芩连汤既可回调梭状杆菌属,又可增加肠道中细菌物种的多样性,提示该方对菌群失调性腹泻大鼠肠道菌群具有调节作用。

综上所述,本研究发现葛根芩连汤对肠道菌群氨基酸代谢、糖和脂肪酸代谢途径均有影响,这一结果提示通过调整肠道菌群结构并改善其代谢途径可能是葛根芩连汤治疗菌群失调性腹泻的机制之一。葛根芩连汤对菌群失调性腹泻模型大鼠肠道菌群具有调节作用。目前,16S rRNA的测序技术可用于菌群失调性疾病评价,尤其对探讨中药复方在临床治疗疾病及其机制方面具有指导意义。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,还有待于进一步深入探讨。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] SULLIVAN A, EDLUND C, NORD C E. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora[J]. Lancet Infect Dis, 2001, 1(2): 101-114.
- [2] 李旻. 人体肠道菌群结构与宿主代谢的相关性研究[D]. 上海:上海交通大学, 2009.
- [3] 李自辉, 庞牧, 林佩琦, 等. 基于16S rRNA技术分析柴胡龙骨牡蛎汤对精神分裂症大鼠肠道菌群多样性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(13): 1-8.
- [4] 徐志毅. 肠道正常菌群与人的关系[J]. 微生物学通报, 2005, 32(3): 117-120.
- [5] 潘爱松. 葛根芩连汤灌肠治小儿急性菌痢[J]. 浙江中医药大学学报, 1998(4): 16.
- [6] 沈健, 陈建杰, 陈逸云, 等. 观察葛根芩连汤对轮状病毒腹泻的治疗及思考[C]//全国第4届中西医结合传染病学学术会议论文汇编. 上海: 出版者不详, 2012.
- [7] 招志辉. 葛根芩连汤传统煎煮与十功能煎药机煎煮一致性评价的初步研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2018.
- [8] 杨璐嘉, 来智慧, 官松美, 等. 几种临床常用抗生素诱导小鼠腹泻的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2020, 45(8): 825-833.
- [9] 石坤. 基于肠道菌群的焦苍术抗腹泻药效及其作用机制研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2020.
- [10] 邢茜. 参附注射液对重度脓毒症大鼠肠粘膜上皮细胞

- 胞紧密连接的影响[D]. 杭州:浙江中医药大学, 2014.
- [11] 周旋. 基于病证结合探索冠心病痰证赋苔微生物的研究[D]. 广州:广州中医药大学, 2019.
- [12] 杜海洋, 杨光勇, 何光志, 等. 基于16S rRNA高通量测序研究氨苄西林钠对SD大鼠肠道菌群结构的影响[J]. 家畜生态学报, 2020, 41(11): 29-34.
- [13] SEGATA N, IZARD J, WALDRON L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation [J]. *Genome Biol*, 2011, 12(6): R60.
- [14] LANGILLE M G, ZANEVELD J, CAPORASO J G, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences [J]. *Nature Biotechnol*, 2013, 31(9): 814-821.
- [15] BESTED A, LOGAN A, SELHUB E. Intestinal microbiota, probiotics and mental health: from metchnikoff to modern advances: part III -convergence toward clinical trials [J]. *Gut Pathog*, 2013, 5(1): 3-18.
- [16] 刘昌孝. 肠道菌群与健康、疾病和药物作用的影响[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(1): 1-14.
- [17] ZHANG L, HUANG Y, ZHOU Y, et al. Antibiotic administration routes significantly influence the levels of antibiotic resistance in gut microbiota [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(8): 3659-3666.
- [18] GIANNELLI F R. Antibiotic-associated diarrhea [J]. *JAAPA*, 2017, 30(10): 46-47.
- [19] 钟琴娟, 叶建樑, 唐宁, 等. 建中汤肠内灌注对抗生素相关性腹泻患者肠道菌群、黏膜功能及炎症因子表达的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2020, 28(3): 92-97.
- [20] 张俊杰, 张淑静, 董瑞娟, 等. 高通量测序研究中药经方对正常小鼠肠道菌群的影响[J]. 世界中医药, 2019, 14(5): 1123-1132, 1138.
- [21] 陈琳琳, 李后开. 靶向肠道微生态: 中药药效机理研究的新机遇与挑战[J]. 上海中医药杂志, 2020, 54(2): 14-20.
- [22] 于岚, 邢志凯, 米双利, 等. 中药对肠道菌群的调节作用[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(1): 34-39.
- [23] 李玉波, 马雪玲, 李志更, 等. 基于肠道菌群探讨保和丸对高脂饮食SD大鼠血脂的作用[J]. 世界中医药, 2018, 13(9): 2107-2110, 2116.
- [24] 陈阳, 陆杰, 朱思敏, 等. 基于高通量测序技术研究葛根苓连汤及其配伍对急性肠炎大鼠肠道菌群多样性的影响[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(6): 1406-1417.
- [25] XU B L, ZHANG G J, JI Y B. Active components alignment of GegenQinliantang protects ulcerative colitis by attenuating inflammatory and oxidative stress [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 162: 253-260.
- [26] FU Y L, YI W, HUANG H, et al. Efficacy of herbal medicine (Gegen Qinliantang) on ulcerative colitis: a systematic review of randomized controlled trials [J]. *Medicine*, 2019, 98(52): e18512.
- [27] 惠华英, 何云山, 罗成宇, 等. 葛根苓连汤对肠道湿热证泻泄小鼠肠道微生物活度和酶活性的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2020, 32(10): 1140-1144.
- [28] WU Y H, WANG D, FU C M, et al. Traditional Chinese medicine Gegen Qinliantang ameliorates irinotecan chemotherapy-induced gut toxicity in mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 2252-2261.
- [29] LI Y, LI Z X, XIE C Y, et al. Gegen Qinliantang enhances immunity and protects intestinal barrier function in colorectal cancer patients via gut microbiota [J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(48): 7633-7651.
- [30] LI G, YIN P, CHU S, et al. Correlation analysis between GDM and Gut microbial composition in late pregnancy [J]. *J Diabet Res*, 2021, 2021(1): 1-17.
- [31] PORTER N T, MARTENS E C. The critical roles of polysaccharides in gut microbial ecology and physiology [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2017, 71: 349-369.
- [32] 谷莉. 不同鼠种的肠道菌群在不同饮食结构干预中的组成改变[D]. 长沙: 中南大学, 2014.
- [33] REYNOLDS C B, EMERSON J E, LUCIA D L R, et al. The *Clostridium difficile* cell wall protein CwpV is antigenically variable between strains, but exhibits conserved aggregation-promoting function [J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(4): 1-14.
- [34] FERREYRA J A, WU K J, HRYCKOWIAN A J, et al. Gut microbiota-produced succinate promotes *C. difficile* infection after antibiotic treatment or motility disturbance [J]. *Cell Host Microbe*, 2014, 16(6): 770-777.
- [35] GAGNIÈRE J, RAISCH J, VEZIAN J, et al. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2016(2): 501-518.
- [36] 李扬. 葛根苓连汤对结直肠癌患者肠道菌群及肠黏膜屏障功能的影响[D]. 唐山: 华北理工大学, 2020.

[责任编辑 周冰冰]