

## 实验研究

## 高通量测序研究中药经方对正常小鼠肠道菌群的影响

张俊杰<sup>1</sup> 张淑静<sup>2</sup> 董瑞娟<sup>2</sup> 李珂<sup>1</sup> 叶贺贺<sup>1</sup> 葛东宇<sup>2</sup> 吴莹<sup>1</sup>

(1 北京中医药大学生命科学院,北京,100029; 2 北京中医药大学中医学院,北京,100029)

**摘要** 目的:探讨四君子汤、麻杏石甘汤、麻杏石甘汤合四君子汤对正常小鼠肠道菌群多样性的影响。方法:将 20 只 Balb/c 小鼠随机分为正常组、四君子汤组、麻杏石甘汤组、麻杏石甘汤合四君子汤组 4 组,每组 5 只,除正常组给予无菌双蒸水灌胃外,其余 3 组分别以对应汤药灌胃。于灌胃第 4、7 天无菌收集各组小鼠粪便,16S rRNA 高通量测序法检测各组药物对小鼠粪便中微生物群落结构及多样性变化的调节。结果:各药物的干预使正常小鼠肠道菌群的 OTU (operational taxonomic unit) 数量产生了变化,麻杏组菌群丰富度增加尤为显著 ( $P < 0.05$ ); 2 时间段各中药组的菌群香农指数 (Shannon index) 较正常组比较均有变化、麻杏组的菌群多样性增加更为明显;正常组分别与给药组比较,正常组与四君组间共有的 OTUs 数目最多,其菌群间的相似性最高;药物的使用会使小鼠肠道的优势菌群发生结构及比例的变化;给药组与正常组小鼠的总体菌群在结构上分离明显、差异有统计学意义;四君子汤、麻杏石甘汤合四君子汤的使用会显著性地使与短链脂肪酸 (SCFA) 产生相关的菌属丰度增加。结论:与正常组比较,各中药组小鼠肠道菌群结构及多样性均发生明显变化。

**关键词** 肠道菌群;四君子汤;麻杏石甘汤;高通量测序;16S rRNA;小鼠;经方

### Effects of Traditional Chinese Medicine Prescriptions on the Intestinal Flora of Normal Mice via High-throughput Sequencing

Zhang Junjie<sup>1</sup>, Zhang Shujing<sup>2</sup>, Dong Ruijuan<sup>2</sup>, Li Ke<sup>1</sup>, Ye Hehe<sup>1</sup>, Ge Dongyu<sup>2</sup>, Wu Ying<sup>1</sup>

(1 School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2 School of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**Abstract Objective:** To explore the effects of Sijunzi Decoction, Maxingshigan Decoction, the combination of Maxingshigan and Sijunzi Decoction on the diversity of intestinal flora in normal mice. **Methods:** A total of 20 Balb/c mice were randomly divided into 4 groups: the normal group, the Sijunzi Decoction group, the Maxingshigan Decoction group, the combined Maxingshigan and Sijunzi Decoction group, with 5 mice in each group. Sterile double distilled water was administrated to the normal group by gavage, while the other 3 groups were given the corresponding decoction by gavage. The feces of mice in each group were collected aseptically on the 4th and 7th day of gavage. The 16S rRNA high-throughput sequencing method was used to detect the changes of microbial community structure and diversity in the feces of mice in each group. **Results:** The intervention of each drug resulted in changes in the numbers of OTU (operational taxonomic unit) in the intestinal flora of normal mice, and the increase in the abundance of the Maxingshigan Decoction group was especially significant ( $P < 0.05$ ). In the two time periods, the Shannon indexes of all traditional Chinese medicine groups were different from that of the normal group, and the increase of the flora diversity of the Maxingshigan Decoction group was more significant. Compared individually with each drug group, the number of OTUs shared between the normal group and the Sijunzi Decoction group was the highest, and the similarity of the two intestinal floras was the highest. The use of drugs changed the structure and proportion of dominant bacteria in the intestinal tract of mice. The total microflora of mice in the drug groups and the normal group were significantly isolated from each other. The use of Sijunzi Decoction and the combination of Maxingshigan and Sijunzi Decoction can significantly increase the abundance of bacteria related to SCFA production. **Conclusion:** Compared with the normal group, the structure and diversity of intestinal flora of mice in every Chinese medicine group changed significantly.

**Key Words** Intestinal flora; Sijunzi decoction; Maxingshigan decoction; High-throughput sequencing; 16S rRNA; Mice; Classical prescription

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2019.05.014

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81473520); 北京中医药大学校杰青项目 (2016-JYB-XJQ001); 北京中医药大学创新团队“经方现代应用关键科学问题的基础研究”项目 (2011-CXD-04)

作者简介: 张俊杰 (1992.04—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 感染性疾病的中医药防治, E-mail: zhangjunjiebucom@163.com

通信作者: 葛东宇 (1971.07—), 男, 学士, 实验师, 研究方向: 中西医结合防治病毒性疾病, E-mail: dongyuge@163.com; 吴莹 (1980.01—), 女, 博士, 教授, 研究方向: 中西医结合防治病毒性疾病, E-mail: aqiwyuying@hotmail.com

数量巨大、种类繁多的肠道微生物构成了人体中最复杂的微生态系统<sup>[1]</sup>。肠道菌群与宿主之间互利共生、相互依存,肠道菌群在调控新陈代谢的途径、维生素等人体必需成分的合成以及促进免疫系统的建成等方面都发挥重要作用;而宿主肠道则为菌群提供富含营养、适宜的生存环境<sup>[2-3]</sup>,宿主与肠道菌群间的稳定平衡对维系人体的健康发挥着不可或缺的作用。近年来,Illumina 高通量测序等一些前沿性技术的应用加速了肠道菌群的研究进展,使得肠道菌群与人体生理病理变化间的联系得到更深入的研究。

首载于《太平惠民和剂局方》的四君子汤,是益气健脾之经典方剂,临床上用于治疗脾胃气虚诸证。诸多研究表明,四君子汤可以通过对肠道菌群结构及多样性的调节来对机体发挥一系列的作用。孟良艳<sup>[4]</sup>等通过对大鼠粪便 16S rDNA 的测序,发现四君子汤可以通过调节肠道中益生菌数量的变化、改变肠道菌群的多样性来改善脾虚大鼠肠道菌群的失调。温秋玉<sup>[5]</sup>等的临床研究显示,采用肠道菌群培养法分析四君子汤对新生儿窒息患儿肠道菌群多样性的影响,结果显示,四君子汤治疗后,患儿双歧杆菌及肠球菌的肠道定植数量较对照组明显增多,说明四君子汤可以改善新生儿窒息患儿肠道菌群的失衡情况。

麻杏石甘汤(麻黄杏仁甘草石膏汤)出自《伤寒论》,具有辛凉宣肺、清热平喘的功用,主治外感风寒之肺热咳喘、邪热雍肺证,临床上在防治证属邪热雍肺的甲型 H1N1 流感中应用广泛<sup>[6]</sup>。本实验室前期研究证实,麻杏石甘汤合四君子汤能明显增强麻杏石甘汤治疗流感病毒小鼠的效果。因此,本实验采用四君子汤、麻杏石甘汤、麻杏石甘汤合四君子汤分别给正常小鼠灌胃,高通量测序分析各组小鼠肠道菌群结构及多样性的变化,以明确各组药物对肠道菌群的作用以及四君子汤是否通过对肠道菌群的调节来对麻杏石甘汤的治疗起到增效作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 SPF 级 BALB/c 小鼠 20 只,17 ~ 19 g,雄性,购于北京维通利华实验动物技术有限公司(许可证号:SCXK(京)2016-0011),于 SPF 级动物房中饲养。

1.1.2 药物 1)四君子汤:茯苓 10 g、党参 10 g、炙甘草 10 g、白术 10 g,共需 1 剂。药物浸泡于蒸馏水中 40 min,第一煎大火煮沸后,小火煎煮 30 min;第二煎大火煮沸后,小火煎煮 20 min,最后将 2 次煎煮汤药混合浓缩至 26.67 mL,制成含生药 1.5 g/mL 的

药液。2)麻杏石甘汤:麻黄 6 g、杏仁 9 g、生石膏 24 g、生甘草 6 g,共需 1 剂。药物(麻黄与生石膏单独浸泡)浸泡于蒸馏水中 40 min,生石膏先煎 30 min,加入杏仁、生甘草熬至水沸后,小火煎煮 15 min,加入麻黄后下,再煎煮 5 min;倒出汤药后加水进行第二次煎煮(大火煮沸后,小火煎煮 10 min),最后将 2 次所煮汤药混合浓缩至 30 mL,制成含生药 1.5 g/mL 的药液。3)麻杏石甘汤合四君子汤:将以上制备好的 2 组汤药各取出 10.5 mL 共 21 mL 混合并浓缩至 10.5 mL。以上药物均购于北京中医药大学国医堂。

### 1.2 方法

1.2.1 分组 小鼠按随机数字表法随机分为 4 组:正常组(Z 组)、四君子汤组(简称四君组 S 组)、麻杏石甘汤组(简称麻杏组即 M 组)、麻杏石甘汤合四君子汤组(简称麻四组 MS 组),每组 5 只(数字 1 ~ 5 对应第 4 天取材样本、数字 6 ~ 10 对应第 7 天取材样本)。

1.2.2 给药方法 正常组给予无菌双蒸水灌胃,0.15 mL/次,2 次/d;其余 3 组分别以对应汤药灌胃,0.15 mL/次,2 次/d。4 组动物均连续灌胃 7 d。

1.2.3 取材方法 1)取无菌滤纸一张;2)带好无菌手套,一手固定小鼠颈部,另一只手按摩小鼠肛门附近,使其排出的粪便掉落在干净的滤纸上;3)用灭过菌的镊子将粪便(不少于 3 粒)夹到冻存管(Corning)里,拧紧盖子,标清编号,放到液氮中;

1.2.4 Illumina 高通量测序 16S rRNA 测序实验流程 粪便 DNA 提取;设计合成、引物接头;PCR 扩增、产物纯化;PCR 产物定量和均一化;Miseq 文库构建、Illumina 测序。以上过程均由美吉生物公司完成。

1.3 统计学方法 采用 SPSS Statistics 20.0 统计软件进行数据分析,采用 One Way ANOVA 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 粪便样本微生物测序 OUT 分类结果 要了解样本测序结果中的菌属等数目信息,就需要对序列进行聚类。通过聚类,将序列按照彼此的相似性分归为许多小组,一个小组就是一个 OTU。通常在 97% 的相似水平下的 OTU 进行生物信息统计分析。经 Illumina 测序后,4 组 40 个样本总共获得 1 167 427 条优化序列,平均每个样本 29 186 条序列、342 个 OTUs。其中正常组 10 个样本,共 301 851 条序列、3 356 个 OTUs;四君组 10 个样本,共 295 551 条序列、3 387 个 OTUs;麻杏组 10 个样本,共 289 722

条序列、3 592 个 OTUs;麻四组 10 个样本,共280 303 条序列、3 329 个 OTUs。经统计,各给药组的干预均对正常小鼠肠道菌群的 OTU 数量产生影响。除麻四组外,各给药组的 OTU 数量均升高,麻杏组尤为明显( $P < 0.05$ ),表明各组药物均能影响正常小鼠肠道菌群的丰富度。各组样品相关信息见表 1。

表 1 各组小鼠粪便样品测序结果及多样性指数

| Sample ID | Reads | OTU | ace | chao | shannon |
|-----------|-------|-----|-----|------|---------|
| Z1        | 32551 | 331 | 367 | 374  | 3.93    |
| Z2        | 28098 | 376 | 402 | 401  | 4.12    |
| Z3        | 27840 | 343 | 384 | 389  | 3.77    |
| Z4        | 31774 | 339 | 386 | 378  | 3.57    |
| Z5        | 27339 | 280 | 347 | 373  | 3.67    |
| Z6        | 31601 | 350 | 384 | 385  | 4.04    |
| Z7        | 32696 | 361 | 405 | 407  | 3.71    |
| Z8        | 28941 | 314 | 345 | 344  | 3.72    |
| Z9        | 33976 | 314 | 366 | 379  | 3.42    |
| Z10       | 27035 | 348 | 391 | 411  | 3.85    |
| S1        | 36454 | 317 | 361 | 358  | 3.87    |
| S2        | 28995 | 318 | 356 | 375  | 3.94    |
| S3        | 31634 | 352 | 398 | 409  | 3.43    |
| S4        | 28450 | 362 | 405 | 415  | 3.82    |
| S5        | 26628 | 334 | 375 | 369  | 3.49    |
| S6        | 24241 | 332 | 363 | 360  | 3.94    |
| S7        | 26916 | 307 | 349 | 349  | 3.4     |
| S8        | 33678 | 341 | 383 | 373  | 3.69    |
| S9        | 29310 | 361 | 409 | 422  | 3.73    |
| S10       | 29245 | 363 | 404 | 407  | 3.65    |
| M1        | 28697 | 356 | 402 | 413  | 4.05    |
| M2        | 29486 | 355 | 402 | 443  | 3.84    |
| M3        | 29628 | 339 | 368 | 384  | 4.02    |
| M4        | 26913 | 376 | 412 | 422  | 4.1     |
| M5        | 27029 | 398 | 430 | 426  | 4.1     |
| M6        | 27958 | 357 | 392 | 396  | 4.07    |
| M7        | 35262 | 378 | 410 | 413  | 4.14    |
| M8        | 26948 | 334 | 359 | 361  | 3.97    |
| M9        | 29445 | 383 | 408 | 419  | 4.28    |
| M10       | 28356 | 316 | 345 | 352  | 3.18    |
| MS1       | 33442 | 299 | 358 | 370  | 3.3     |
| MS2       | 25857 | 354 | 400 | 394  | 3.69    |
| MS3       | 34074 | 348 | 392 | 390  | 3.76    |
| MS4       | 26617 | 318 | 372 | 372  | 3.64    |
| MS5       | 28674 | 359 | 386 | 387  | 4.15    |
| MS6       | 32361 | 299 | 363 | 368  | 3.11    |
| MS7       | 23637 | 344 | 394 | 397  | 3.92    |
| MS8       | 24585 | 352 | 386 | 396  | 3.8     |
| MS9       | 27474 | 339 | 391 | 393  | 3.79    |
| MS10      | 23582 | 317 | 362 | 360  | 3.81    |

2.2 药物对正常小鼠肠道菌群多样性的影响  
Shannon 指数用来评价微生物群落的多样性,利用各样本的测序量在不同测序深度时的微生物多样性指数构建曲线,以此反映各样本在不同测序数量时的微生物多样性。当曲线趋于平坦时,说明测序数据

量足够大,可以反映样本中绝大多数的微生物信息,其数值的高低可以表示菌群数量的变化。2 时间段各中药组菌群 Shannon 指数较正常组比较均有变化:在给药第 4 天,四君组菌群 Shannon 指数较正常组比较,指数值略有降低,其菌群数量略有减少;麻杏组 Shannon 指数较正常组升高,其菌群数量增加;麻四组菌群 Shannon 指数较正常组比较,指数有所减少,其菌群数量有所降低。给药第 7 天各组指数趋势变化大致相同。综上所述,表明各组药物均可以对正常小鼠肠道菌群的数量及多样性产生影响。见图 1。

2.3 药物对正常小鼠肠道菌群相似度的影响  
通过韦恩图(Venn diagram)可以比较分析各组之间独有和共有的 OTU 数目,进而比较多个样本群落间组成的相似度与重叠关系。正常组与四君组:用药第 4 天与用药第 7 天,2 组共有的 OTUs 数目分别为 445、447,正常组独有的 OTUs 数目分别为 20、29,四君组独有的 OTUs 数目为 29、22;正常组与麻杏组:用药第 4 天与用药第 7 天,2 组共有的 OTUs 数目分别为 435、441,正常组独有的 OTUs 数目分别为 30、35,麻杏组独有的 OTUs 数目为 49、29;正常组与麻四组:用药第 4 天与用药第 7 天,2 组共有的 OTUs 数目分别为 435、441,正常组独有的 OTUs 数目分别为 30、35,麻四组独有的 OTUs 数目为 42、43。结果表明,随着用药时间的延长,各中药组与正常组之间共有的 OTUs 数目均增加。其中,四君组与正常组间共有的 OTUs 数目最多,其菌群间的相似性最高。见图 2。

2.4 药物对小鼠肠道菌群结构组成的影响  
通过群落结构组分图可以得知一个或多个样本在各分类水平上的分类学比对情况。正常组与各中药组在门(Phylum)与属(Genus)2 个分类学水平上的差异。见图 3。

2.4.1 在门分类学水平上,在第 4 天与第 7 天 2 个时间段,四组样本的菌群组成以拟杆菌门 Bacteroidetes、厚壁菌门 Firmicutes 2 个菌门为主,两者所占比例总和在各组各时间段内均大于 94%。

用药第 4 天,拟杆菌门在各中药组中所占比例均大于正常组,其中以麻四组所占比例最高(66.05%),麻杏组与麻四组的拟杆菌门占比相较正常组分别增加了 5.03%、5.68%,四君组与正常组相差不大,仅增加了 0.16%;厚壁菌门在各中药组中所占比例均小于正常组,其中以麻四组所占比例最低(28.91%),麻杏组与麻四组的厚壁菌门占比相较正常组分别降低了 6.19%、8.66%,四君组与正常组相差不大,仅减少了 0.45%。

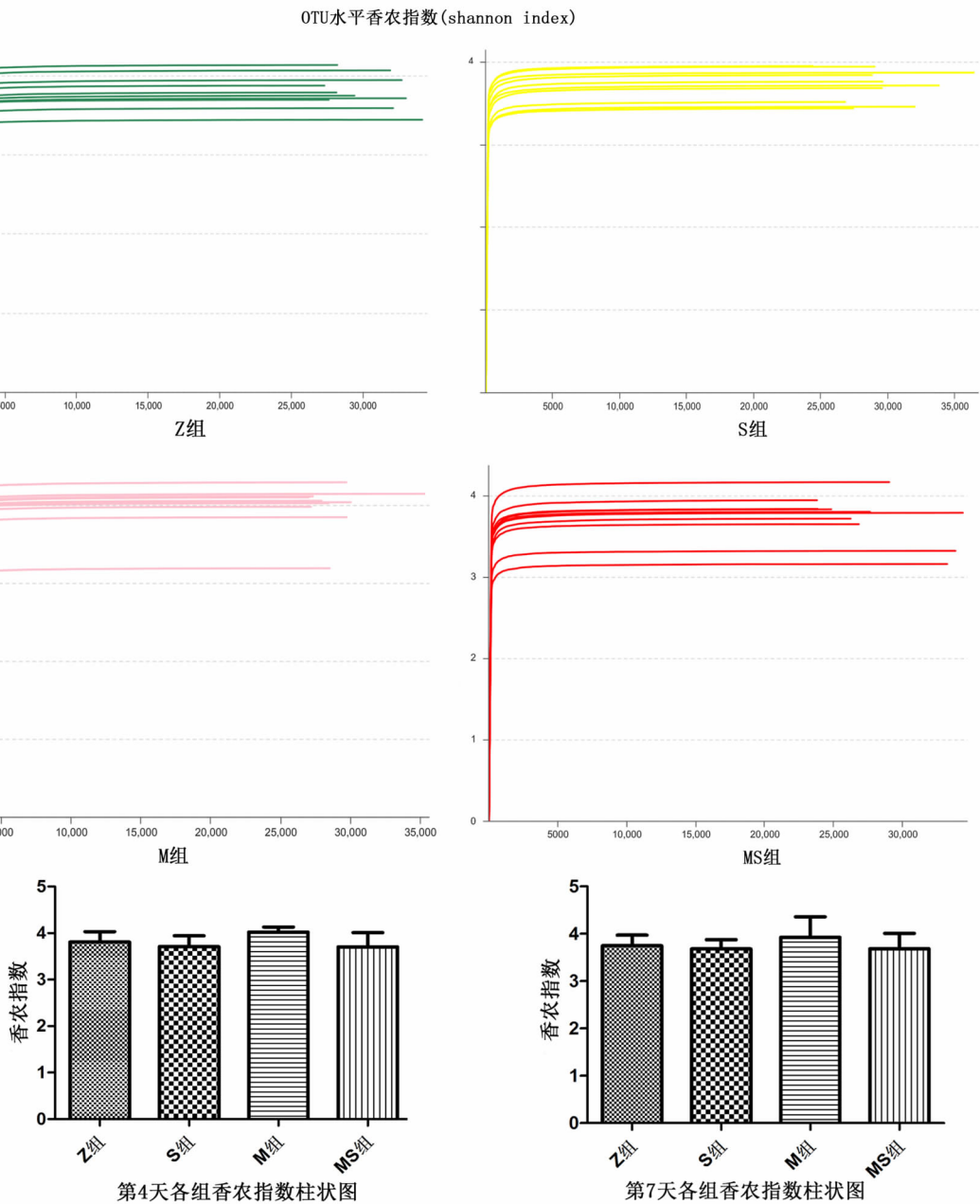


图1 各组小鼠菌群香农指数 (shannon index) 图

用药第7天,拟杆菌门在麻四组中占比最高(72.84%),比正常组增加2.6%,麻杏组较正常组降低12.59%,四君组与正常组比较,差异无统计学意义,仅增加0.1%;厚壁菌门在麻四组中占比最低(23.63%),相较正常组降低3.81%,麻杏组较正常组升高11.85%,四君组与正常组相差不大,仅增加0.64%。

2.4.2 在属分类学水平上,norank\_f\_Bacteroidales\_S24\_7\_group为4组各时间段占比最高的种属,其比例均大于24%。

在第4天与第7天的正常组中,norank\_f\_Bacteroidales\_S24\_7\_group、乳杆菌属 *Lactobacillus*、Prevot-

tellaceae\_UCG\_001、*Alistipes* 是肠道菌群中占比最高的4个种属。

服用四君子汤后,样本菌群结构基本不变、而其优势菌属的比例有所变化:norank\_f\_Bacteroidales\_S24\_7\_group的占比在2时间段均升高(分别升高1.62%、2.24%);Prevotellaceae\_UCG\_001的占比均下降(2时间段分别降低0.73%、5.53%);乳杆菌属占比在给药第4天较正常组降低1.33%,但随着给药时间的延长,在第7天其占比较正常组增加0.78%;*Alistipes*的占比在2时间段均降低(分别降低1%、0.15%)。

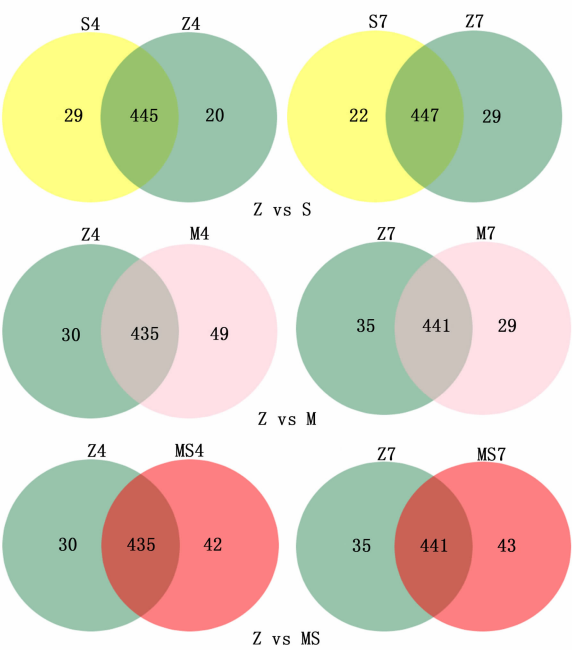


图 2 各中药组与正常小鼠菌群 Venn 图

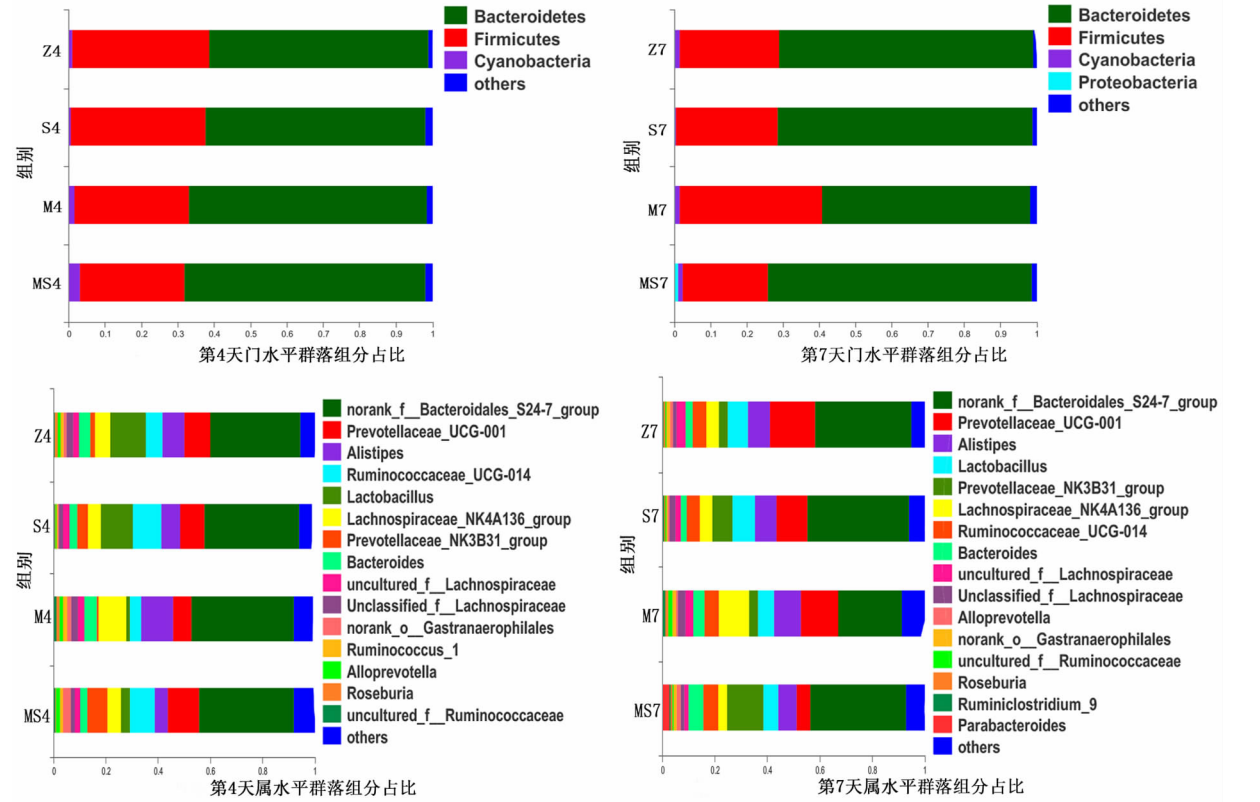
服用麻杏石甘汤后,在第 4 天和第 7 天样本的菌群结构中,Lachnospiraceae-NK4A136-group 的占比均升高;Alistipes 的占比在 2 时间段均升高(分别升高 3.87%、1.76%);Prevotellaceae\_UCG\_001 的占比均下降(2 时间段分别降低 2.89%、2.83%)。

服用麻杏石甘汤合四君子汤后,普雷沃氏菌科在样本中的占比升高:给药第 4 天,Prevotellaceae\_UCG\_001 占比增加 1.94%、给药第 7 天,Prevotellaceae-NK3B31-group 以 13.9% 的占比成为样本中仅次于 norank\_f\_Bacteroidales\_S24\_7\_group 的种属;Alistipes 的占比在 2 时间段均降低(分别降低 3.34%、1.33%);Ruminococcaceae-UCG-014 在给药第 4 天占比相较正常组增加 3.16%。

2.5 药物对整体菌结构变化的影响 对门与属 2 个分类学水平群落结构的分析已证实 3 种药物可以对小鼠肠道菌群的结构产生影响。接下来采用 weighted UniFrac 距离矩阵的 PCoA 分析进行剖析,以展示菌群之间的相似度,来查看不同组别间肠道菌群的整体结构差异是否显著。每个散点代表一个个体,当散点越聚集,说明其差异性越小、相似性越大;当散点越分散,说明其差异性越大。各给药组与正常组间比较,差异有统计学意义,表明药物干预组小鼠与正常组小鼠的总体菌群在结构上分离明显、差异有统计学意义。见图 4。

## 2.6 药物组与正常小鼠肠道菌群的差异

LEfSE 表示显著性差异,是一种用于发现高维生物标识和揭示基因组特征的软件,可以检测到与



群落结构组分图

图 3 各组小鼠群落结构组分图

PCoA on OTU level

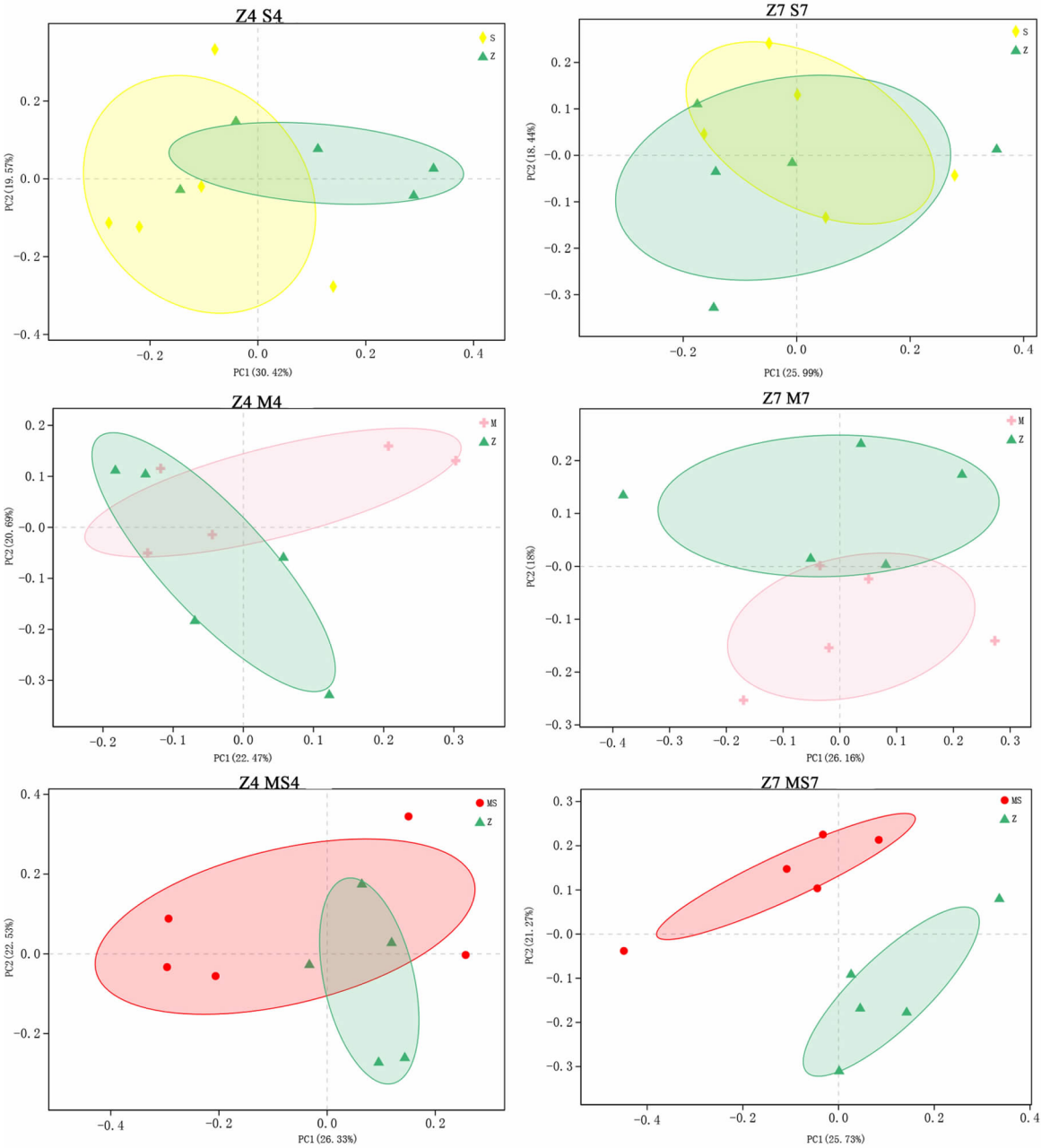


图4 UniFrac PCoA 分析比较样本间的差异

丰度有显著性差异的类群。为了鉴定不同条件下的特定细菌分类群，通过线性判别分析效应大小 (LDA) 比较来自正常组、四君组、麻杏组、麻四组肠道微生物每个物种丰度对差异效果影响的大小。

2.6.1 在属分类学水平上,用药第4天有18种肠道细菌在正常组与四君组间表现出显著差异。Eubacterium\_brachy\_group、Eubacterium\_ventriosum\_group、布劳特氏菌属 Blautia、Erysipelatoclostridium、Anaerofustis、葡萄球菌属 Staphylococcus 等在四君组中富集;罗氏菌属 Roseburia、Lachnospiraceae\_g\_In-

certae\_Sedis、Erysipelotrichaceae\_g\_uncultured、Clostridiaceae\_1、Candidatus\_Arthromitus、Tyzzerella\_3 等在正常组中富集。

用药第7天,有12种肠道细菌在正常组与四君组间表现出显著差异。Eubacterium\_brachy\_group、Eubacterium\_ventriosum\_group、Coriobacteriaceae\_g\_uncultured 等在四君组中富集;Gastranaerophilales、Ruminococcaceae\_UCG\_009、Lachnospiraceae\_UCG\_001 等在正常组中富集。见图5。

2.6.2 在属分类学水平上,用药第4天有20种肠道细菌在正常组与麻杏组间表现出显著差异。Can-

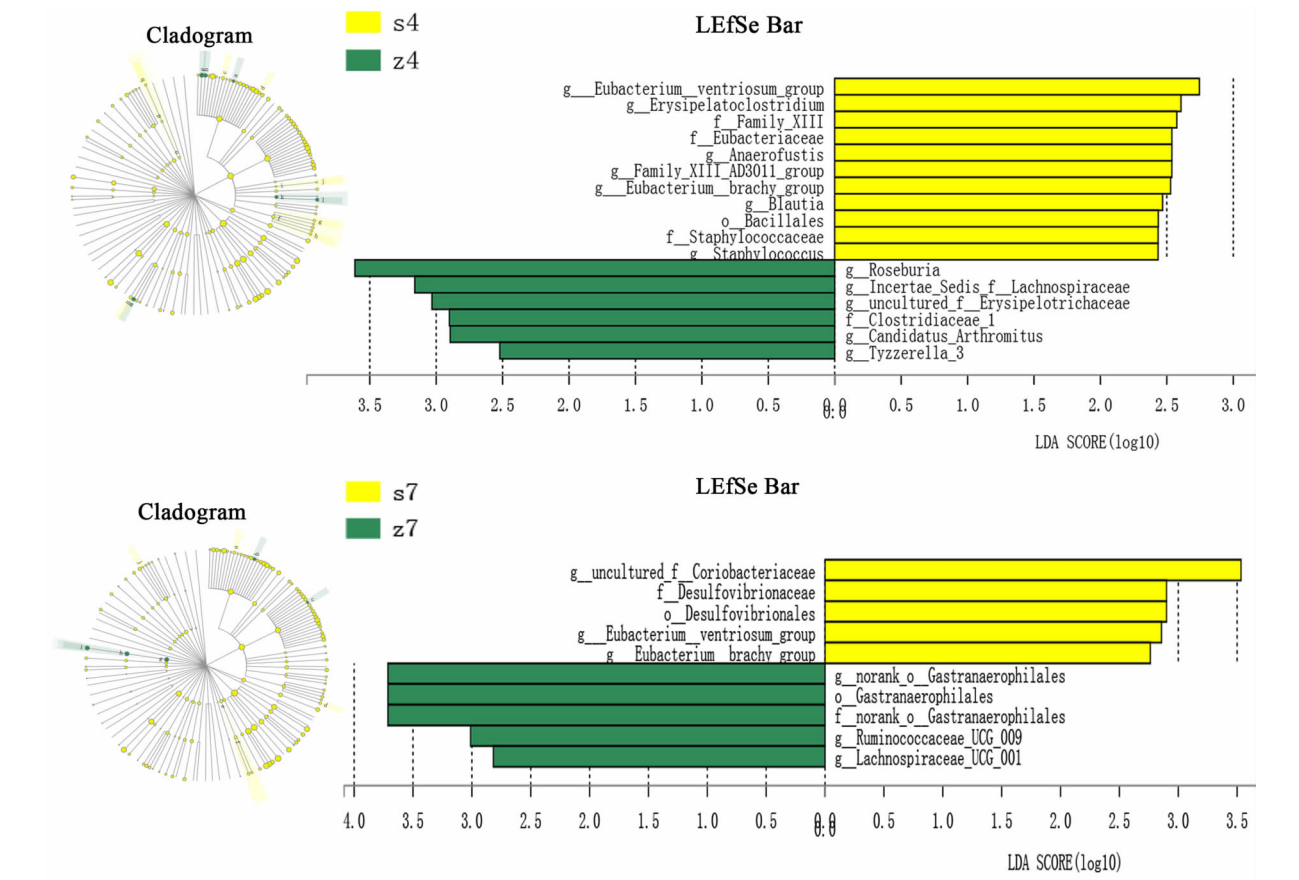


图 5 正常组 四君组显著性差异图

didatus \_ Saccharimonas、Saccharibacteria、Peptococcaceae\_g\_uncultures、Coprococcus\_1 粪球菌属\_1 等在麻杏组中富集；Lactobacillus 乳杆菌属、Clostridiaceae \_ 1、Candidatus \_ Arthromitus、Eubacterium \_ coprostanoligenes\_group、Erysipelotrichia 等在正常组中富集。

用药第 7 天,有 45 种肠道细菌在正常组与麻杏组间表现出显著差异。Tyzzereella、Coprococcus\_1 粪球菌属\_1、Acetatifactor、Ruminiclostridium、Bilophila 嗜胆菌属、Oscillibacter 颤螺旋菌属、Anaerotruncus、Eubacterium \_ brachy \_ group、Candidatus \_ Saccharimonas、Saccharibacteria、Christensenellaceae\_g\_uncultured、Roseburia 罗斯氏菌属、Rhodospirillaceae\_g\_unclassified 等在麻杏组中富集；Bacteroidales\_S24\_7\_group、Bacteroidia、Adlercreutzia 等在正常组中富集。见图 6。

2.6.3 在属分类学水平上,用药第 4 天有 30 种肠道细菌在正常组与麻四组间表现出显著差异。Ruminococcaceae\_g\_unclassified、Parasutterella 帕拉萨特菌属、Enterorhabdus、Erysipelatoclostridium、Staphylo-

coccus 葡萄球菌属、Christensenellaceae \_g\_ uncultured、Anaerofustis 等在麻四组中富集；Lactococcus 乳杆菌属、Defluviitaleaceae \_UCG\_011、Candidatus \_ Arthromitus、Tyzzereella\_3 等在正常组中富集。

用药第 7 天,有 24 种肠道细菌在正常组与麻四组间表现出显著差异。Enterorhabdus、Eubacterium \_ ventriosum\_group、Ruminococcaceae \_g\_ unclassified、Bifidobacterium 双歧杆菌属、Anaerofustis、Prevotellaceae\_NK3B31\_group 等在麻四组中富集；Prevotellaceae\_UCG\_001、Tyzzereella\_3、Defluviitaleaceae\_UCG\_011、Ruminococcaceae\_UCG\_009、Lachnospiraceae \_UCG\_001 等在正常组中富集。见图 7。

### 3 讨论

肠道菌群数量巨多,种类庞大,功能复杂多样<sup>[7]</sup>,在人类的演变过程中与人体形成了稳定的一体,正常的菌群微生态在人体的发育、代谢、免疫、感染的预防及治疗等方面发挥了举足轻重的作用<sup>[8,9]</sup>,而一旦这种平衡的关系被打破,则会引起疾病的发生。近年来,肠道菌群的研究引起了国内外学者的重视。大多数肠道细菌(尤其是厌氧菌)在

体外很难被培养,而现今新技术的应用加速了肠道菌群领域的研究,以帮助了解肠道菌群在健康和疾病中发挥的作用。本实验通过对各组小鼠粪便样本高通量测序结果的研究来分析菌群的整体变化,更进一步的反映各经方药物对小鼠肠道菌群状态的影响。

短链脂肪酸(SCFA),又被称为挥发性脂肪酸。甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸等都囊括其中,尤以乙酸、丙酸和丁酸含量最高<sup>[10]</sup>。肠道中碳水化合物经细菌的发酵、蛋白降解是2种产生SCFA的途径。SCFA可通过参与肠道的能量供应来对宿主起重要的生理调节作用。SCFA在维持肠道PH及电解质平衡、保护肠黏膜、调节免疫等方面均起到重要作用<sup>[11-13]</sup>。丁酸作为SCFA的一种,可

以增加乳杆菌的产量,文献报道<sup>[14]</sup>其可以通过激活Treg细胞和抑制促炎细胞因子产生的通路来调节慢性炎症反应。

高通量测序结果表明,四君子汤、麻杏石甘汤、麻杏石甘汤合四君子汤的作用均可以对正常小鼠肠道菌群的结构及比例产生影响。各给药组菌群OTU数量及shannon指数相较正常组变动明显,其菌群丰度及多样性随之变化。UniFrac PCoA分析结果证实各给药组与正常组间菌群结构差异有统计学意义。拟杆菌门与厚壁菌门是小鼠肠道中占比最高的两大菌门,各给药组在第4天的拟杆菌门占比均大于正常组,尤以麻四组最高;给药第7天,麻四组拟杆菌门占比仍高于其他组,而麻杏组拟杆菌门占比下降且低于正常组,四君组拟杆菌门占比与正常

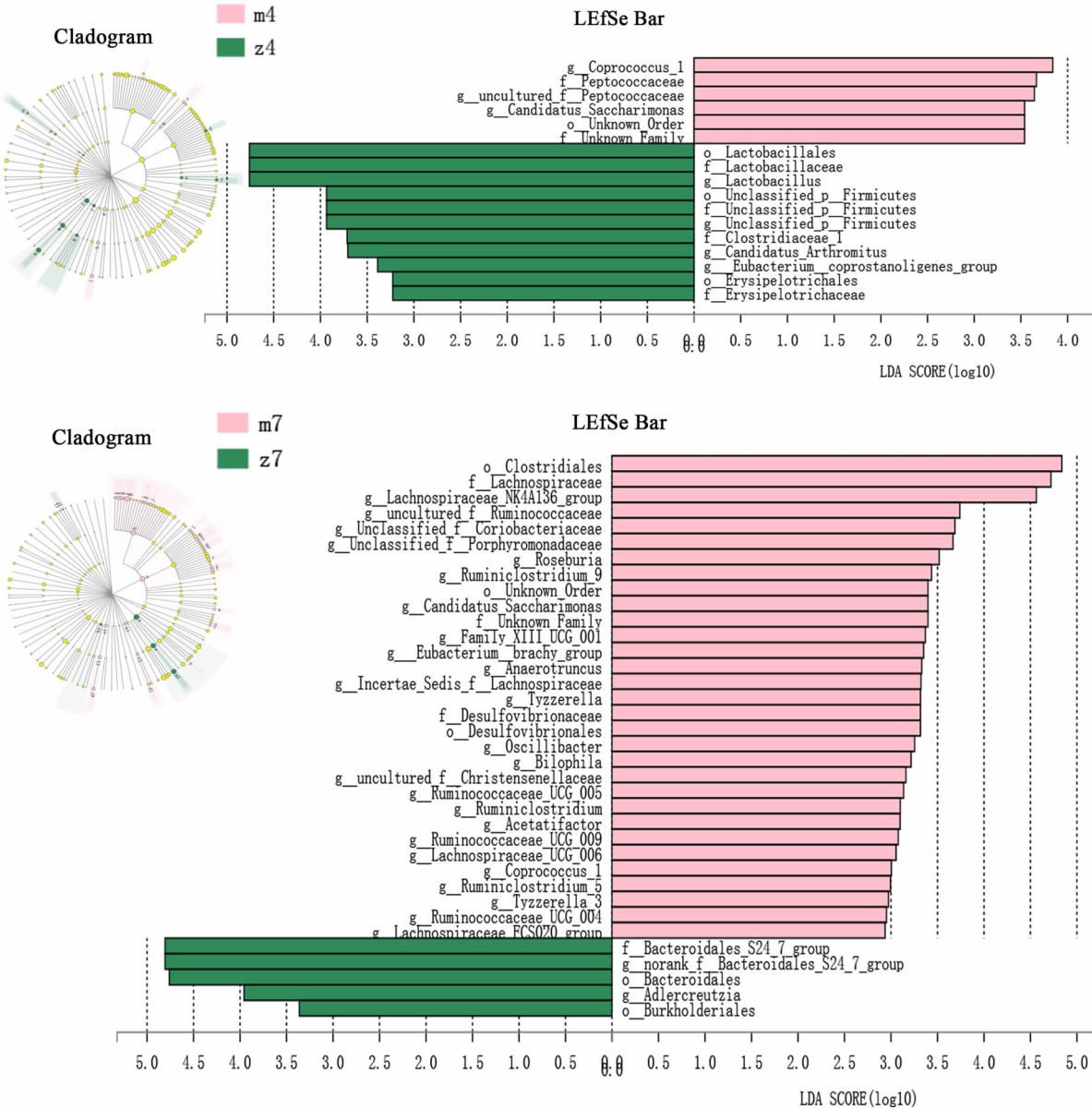


图6 正常组 麻杏组显著性差异图

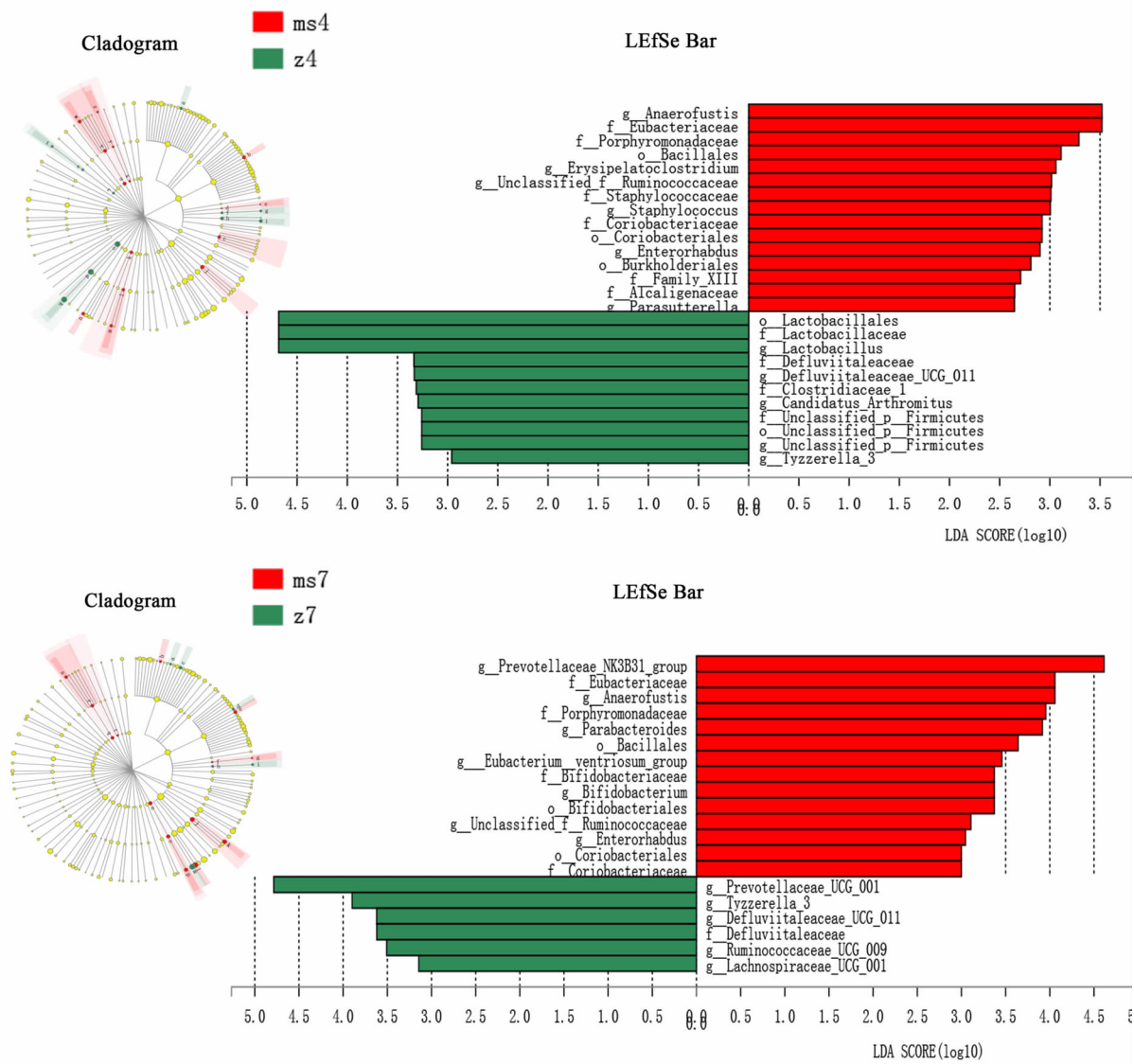


图 7 正常组 麻四组显著性差异图

组相差无几。在属水平上,各给药组的优势菌属结构及比例也有明显变化。乳杆菌属是常见的益生菌,可以通过发酵食物产生乳酸从而降低 PH 值,达到抑制病原菌的目的<sup>[15]</sup>。Alistipes 属是一种常见的病原菌,相关文献报道其可能与结肠炎有关。服用四君子汤后,乳杆菌属占比虽在用药第 4 天下降,但随着用药的延长,其占比在第 7 天明显高于正常组。Alistipes 占比在 2 时间段内相较正常组均有所下降。仅从肠道优势菌属的结构及比例可以推断,在服药初期,例如乳杆菌属的益生菌占比不会出现明显变化,但其在肠道菌群中的占比会随用药时间的延长而出现显著增长的趋势,因此四君子汤的使用可以通过增加有益菌、抑制病原菌来对肠道菌群进行调节。服用麻杏石甘汤后,丁酸产生菌 Lachnospiraceae-NK4A136-group 与病原菌 Alistipes 占比在 2 时间段内均出现了明显升高的趋势,而乙酸产生菌

Prevotellaceae\_UCG\_001 占比均下降,说明服用麻杏石甘汤后,肠道中的不同益生菌有相反的变化趋势,而病原菌会大幅增长,说明麻杏石甘汤调节肠道菌群的平衡作用并不明显。Ruminococcaceae 是一种与丁酸产生有关的菌科。服用麻杏石甘汤合四君子汤后,Ruminococcaceae\_UCG\_014 在给药第 4 天比较正常组显著增加,而 Alistipes 在 2 时间段占比均降低,另有 2 种 Prevotellaceae 菌科的菌属占比均增加。通过菌群优势菌属的变化趋势,我们发现,麻杏石甘汤合四君子汤对肠道菌群的影响并不单单是两单方作用的叠加:病原菌 Alistipes 在合方中的变化趋势与四君组相同而与麻杏组呈相反趋势;乙酸产生菌科 Prevotellaceae 在麻杏组中占比降低而在合方中显著升高;合方的使用,会使在单方中占比均不占优势的丁酸产生菌 Ruminococcaceae 成为优势菌属。我们初步判断,四君子汤及麻四汤的使用可

以增加肠道有益菌属,减少病原菌,且合方的使用会使肠道菌群出现区别于两单方的新变化趋势,合方是否可以通过菌群的变化趋势产生新的作用有待进一步探讨研究。

*Blautia*、*Roseburia*、*Eubacterium \_ ventriosum \_ group*、*Clostridiaceae*、*Ruminococcaceae*、*Lachnospiraceae* 等均是与短链脂肪酸产生相关的细菌。在属水平上的显著性差异分析显示,四君组在用药第4天,*Eubacterium\_ventriosum\_group* 与 *Blautia* 均显著升高,而 *Roseburia* 与 *Clostridiaceae\_1* 的含量降低,诱导免疫应答所必需的共生菌 *Candidatus\_Arthromitus* 分段丝状细菌在四君组中也有了降低的趋势。用药第7天,*Eubacterium\_ventriosum\_group* 菌属仍显著性升高,*Ruminococcaceae\_UCG\_009* 与 *Lachnospiraceae\_UCG\_001* 2 菌属降低。有研究显示<sup>[15]</sup>, *Blautia* 属 *Lachnospiraceae* 科,可通过产生乙酸为器官供能,而一些产丁酸盐的菌属可以降低 *Blautia* 的丰度,这可能是由于有机体竞争相同的底物或者形成抑制物质导致的,因此, *Blautia* 的变化与其他产丁酸菌的细菌呈相反趋势也是合理的。麻杏组在用药第4天,*Peptococcaceae\_g\_uncultures* 与 *Coprococcus\_1* 粪球菌属\_1 在麻杏组中显著性增多,乳杆菌属、分段丝状细菌显著降低;给药第7天,*Coprococcus\_1* 粪球菌属\_1、*Oscillibacter* 颤螺旋菌属、*Eubacterium\_brachy\_group*、*Roseburia* 等在麻杏组中显著富集。*Peptococcaceae* 是存在于肠道和呼吸道中的消化球菌科,粪球菌属是常见病原菌,结果显示,给药第4天,常见病原菌增多、益生菌降低;给药第7天,虽然丁酸产生菌属 *Roseburia* 有所升高,但病原菌还是显著增多。因此麻杏石甘汤对肠道菌群的调节作用并不明显。麻四组用药第4天,*Ruminococcaceae\_g\_unclassified* 等在麻四组中显著增加,乳杆菌属与分段丝状细菌显著性减少,减少的此2种菌属与麻杏组第4天减少的菌属一致。而用药第7天,与短链脂肪酸产生相关的2个菌属 *Eubacterium\_ventriosum\_group* 与 *Ruminococcaceae\_g\_unclassified* 增加, *Bifidobacterium* 双歧杆菌属的含量也显著性升高。

我们的研究结果表明,各中药经方均可以改变肠道菌群的构成及比例,四君子汤、麻杏石甘汤合四君子汤的使用会显著性地使与 SCFA 相关的菌属丰度增加,且四君子汤与麻杏石甘汤的合用,使双歧杆菌这一益生菌的丰度显著增加。而麻杏石甘汤合四君子汤明显增强麻杏石甘汤治疗流感病毒小鼠的作用是否与 SCFA 相关菌属的增加有关,需要进一步验证。

#### 参考文献

- [1] 黄坤,吴丽丽,杨云生. 肠道微生态与人类疾病关系的研究进展[J]. 传染病信息,2017,30(3):133-137.
- [2] Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing[J]. *Nature*, 2010, 464(7285):59-65.
- [3] 刘志鹏,冯强. 肠道微生态与疾病[J]. 营养学报,2017,39(2):105-111.
- [4] 孟良艳,陈秀琴,石达友,等. 四君子汤对脾虚大鼠肠道菌群多样性的影响[J]. 畜牧兽医学报,2013,44(12):2029-2035.
- [5] 温秋玉,刘俊峰,黄军华,等. 四君子汤对新生儿窒息患儿肠道菌群及体液免疫的影响[J]. 中国医学创新,2013,10(1):43-44.
- [6] 李玲,戴冰,卢芳国,等. 麻杏石甘汤不同比例配伍对流感病毒感染小鼠影响的研究[J]. 中华中医药杂志,2017,32(1):309-313.
- [7] 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):383-388.
- [8] 薛淮娟,马龙,秦欢,等. 小鼠肠道菌群对外周免疫器官影响的研究进展[J]. 中国免疫学杂志,2018,34(6):953-956.
- [9] 钱麟. 肠道菌群与中医药治疗疾病相关性研究进展[J]. 浙江中西医结合杂志,2018,28(7):606-610.
- [10] 闫晨,刘天宇,卢习角,等. 高效液相色谱法测定人和小鼠粪便中短链脂肪酸[J]. 现代药物与临床,2018,33(6):1319-1323.
- [11] 陈燕,曹郁生,刘晓华. 短链脂肪酸与肠道菌群[J]. 江西科学,2006,24(1):38-40+69.
- [12] 蒙丹丽,梁列新,宋怀宇. 短链脂肪酸在肠道中的生理作用[J]. 中国临床新医学,2018,11(2):198-202.
- [13] 臧凯丽,江岩,孙勇,等. 微生态制剂调节便秘、腹泻人群肠道菌群结构与产短链脂肪酸关键菌属的相关性[J]. 食品科学,2018,39(5):155-165.
- [14] 蒋增良. 基于微生物组学和代谢组学研究月桂酸单甘油酯对生长和健康的作用机制[D]. 杭州:浙江大学,2018.
- [15] Wei X, Tao J, Xiao S, et al. Xiexin Tang improves the symptom of type 2 diabetic rats by modulation of the gut microbiota[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8:3685.

(2018-09-30 收稿 责任编辑:芮莉莉)