

四神丸对腹泻型肠易激综合征大鼠肠道菌群影响的实验研究

刘佳星¹, 王彦礼², 李 彧³, 邹迪新², 王敦方², 马旭冉², 宋红新²,
杨伟鹏^{2*}, 王海南^{4*}

(1. 贵州大学药学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;
3. 北京中医药大学, 北京 100029; 4. 国家药品监督管理局, 北京 100037)

摘要: 研究四神丸对腹泻型肠易激综合征 (diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, IBS-D) 大鼠肠道菌群的影响, 探讨其改善 IBS-D 与肠道菌群的关系。选取 SPF 级雄性 SD 大鼠 45 只, 随机分为正常组、模型组、四神丸组、二神丸组和五味子散组。以复合因素制备脾肾阳虚型 IBS-D 大鼠模型后给药 14 天, 采集大鼠粪便, 提取粪便样本总 DNA, 根据细菌 16S rRNA V3~V4 区设计引物进行扩增, 利用 Illumina Miseq 平台进行高通量测序。动物实验操作过程依照中国中医科学院动物实验伦理委员会的要求执行。研究发现: 四神丸能有效减小 IBS-D 大鼠腹泻指数 ($P<0.05$) 及降低肠道高敏感性 ($P<0.05$)。主成分分析 (PCA)、主坐标分析 (PCoA) 和基于 β 多样性距离的非度量多维尺度分析 (NMDS) 结果显示 5 组大鼠肠道菌群组成存在明显差异。模型组的菌群丰度、均匀度和多样性均最低。与正常组相比, 模型组变形菌门、放线菌门、韦荣球菌属和支原体属显著增加 ($P<0.05$), 普雷沃氏菌属显著减少 ($P<0.05$)。与模型组相比, 四神丸组变形菌门和支原体属显著减少 ($P<0.05$), 梭菌属、Turicibacter 和 Romboutsia 显著增加 ($P<0.05$)。本研究表明四神丸可能是部分通过调节肠道菌群的结构而发挥治疗 IBS-D 的作用, 且二神丸和五味子散之间有协同作用。

关键词: 四神丸; 二神丸; 五味子散; 腹泻型肠易激综合征; 肠道菌群; 高通量测序

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)04-0670-08

Experimental study on the effect of Sishen Wan on intestinal flora in rats with diarrhea-type irritable bowel syndrome

LIU Jia-xing¹, WANG Yan-li², LI Yu³, ZOU Di-xin², WANG Dun-fang², MA Xu-ran²,
SONG Hong-xin², YANG Wei-peng^{2*}, WANG Hai-nan^{4*}

(1. School of Pharmacy, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 4. State Drug Administration, Beijing 100037, China)

Abstract: To investigate the effect of Sishen Wan (SSW) on intestinal flora in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS-D) rats and explore the efficacy of this regiment for improving IBS-D, we divided 45 SPF male SD rats randomly into control, disease, SSW, Ershen Wan (ESW) and Wuweizasan (WWZS) groups. The spleen-kidney-yang deficiency type IBS-D rat model was prepared by a composite factor and administered for 14 days. After collecting the feces of the rats, total DNA was extracted from the stool samples. Primers were designed

收稿日期: 2018-10-11; 修回日期: 2018-11-18.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81273662, 81473592); 国家重大新药创制专项资助项目 (2014ZX09304306-006); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助 (ZXKT17029).

*通讯作者 Tel: 86-10-64093041, Fax: 86-10-64013996, E-mail: hrbywp@sina.com;

Tel: 86-10-88331025, Fax: 86-10-88331072, E-mail: md_wanghainan@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0920

based on the 16S rRNA V3 to V4 regions of the bacteria, and used for high-throughput sequencing with the Illumina Miseq platform. We found that SSW can effectively reduce the diarrhea index ($P<0.05$) and reduce the high sensitivity of intestinal tract ($P<0.05$) of IBS-D rats. The principal component analysis (PCA), principal coordinates analysis (PCoA) and non-metric multidimensional scale analysis (NMDS) based on the Beta diversity distance showed that there were significant differences in the composition of the gut microbiota among the five groups ($P<0.05$). The disease group has the lowest in abundance, uniformity and diversity of gut microbiota. Compared with the control group, the disease group showed a significant increase in Proteobacteria, Actinobacteria, Veillonococcus and Mycoplasma ($P<0.05$), but a significant reduction in Pleaverella ($P<0.05$). Compared with the disease group, SSW administration caused significant reduction in the Proteobacteria and Mycoplasma ($P<0.05$), but significant increases of Clostridium, Turicibacter and Romboutsia ($P<0.05$). Our study shows that SSW has the potential as a therapeutic regiment for treatment of IBS-D due to partial regulation of the intestinal flora. In addition, there is a synergy between ESW and WWZS.

Key words: Sishen Wan; Er Shen Wan; Wuweizisan; diarrhea-predominant irritable bowel syndrome; intestinal flora; high-throughput sequencing

肠易激综合征 (irritable bowel syndrome, IBS) 是一种肠道功能性疾病, 临床主要特征表现为与肠习惯变化相关的复发性腹痛或腹部不适^[1,2], IBS 占总人口的 15.9%^[3]。腹泻型肠易激综合征 (diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, IBS-D) 是 IBS 最常见的一种类型, 其发病因素复杂^[4], 随着微生物生态学的发展, 肠道微生态与 IBS-D 发病关系已成为研究热点。肠道菌群与宿主之间可以相互交流物种和信息。正常情况下, 肠黏膜免疫系统对肠道菌群处于免疫耐受状态, 保持着动态平衡, 肠道菌群失调时, 可能诱发黏膜免疫功能失调, 从而引发肠道疾病^[5]。越来越多的研究表明 IBS-D 是一种免疫-炎症模式的胃肠道疾病, 微生物导致的肠道局部持续性、低级别的炎症反应状态是其病理生理学基础, 肠道微生物与 IBS-D 的关系密切^[6]。

四神丸源自《证治准绳》, “治脾胃虚弱, 大便不实, 饮食不思, 或泄泻腹痛等证”。是治疗脾肾阳虚泄泻的经典名方, 临床效果肯定。相对于化学药物的单一靶点治疗作用, 中药复方成分复杂, 在多病因的复杂性慢性治疗中具有多组分、多靶点和多通路的整体治疗作用。四神丸全方可拆分为二神丸和五味子散。本文基于四神丸对 IBS-D 确切的治疗效果, 采用高通量测序技术研究四神丸、二神丸和五味子散对 IBS-D 大鼠肠道菌群的调节作用, 探索四神丸对大鼠体内肠道菌群的影响和其配伍的合理性。

材料与方

实验动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 45 只, 体重 140~160 g, 北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 许可证号 SCXK (京) 2014-0013。动物实验操作过程依

照中国中医科学院动物实验伦理委员会的要求执行。

药物、试剂及仪器 四神丸由补骨脂、肉豆蔻、吴茱萸、五味子、大枣、生姜组成, 比例为 4:2:1:2:2:2。二神丸由补骨脂、肉豆蔻、大枣和生姜组成, 比例为 2:1:1:1。五味子散由吴茱萸和五味子组成, 比例为 1:2。3 种方剂分别水煎后制成浸膏保存。饮片均购自北京仟草中药饮片有限公司, 经中国中医科学院中药研究所李先端研究员鉴定为合格药材, 按《中国药典》2015 年版检验, 结果均符合规定, 其中饮片的主要成分质量分数补骨脂素和异补骨脂素的总量为 0.90%, 吴茱萸碱和吴茱萸次碱的总量为 3.07%, 五味子醇甲为 0.84%。DNA 提取试剂盒 (美国 Omega Bio-tek 公司); 2% 琼脂糖凝胶 (西班牙 Biowest Agarose 公司); Trans Start Fast Pfu DNA Polymerase (北京全氏金生物技术有限公司); Axy Prep DNA Gel Extraction Kit (美国 Axygen Biosciences 公司); 高速台式冷冻离心机 (Eppendorf5424R, 德国艾本德公司); 超微量分光光度计 (Nano Drop2000, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 电泳仪 (DY-6C, 北京市六一仪器厂); PCR 仪 (ABI Gene Amp@9700, 美国应用生物系统公司); MISEQ 测序仪 (Illumina MiSeq, 美国 Illumina 公司)。

造模方法及实验分组 45 只大鼠, 将其中 36 只按照文献方法^[7-10]造模, 其余 9 只作为正常组, 造模大鼠每只给予 0.2 g·kg⁻¹ 腺嘌呤灌胃 4 周, 从第 3 周起再灌服冰番泻叶水浸剂 (10 mL·kg⁻¹) 2 周。造模后根据实验设计分组: 正常组 (control)、模型组 (model)、四神丸组 (SSW)、二神丸组 (ESW) 和五味子散组 (WWZS)。给药剂量依据: 成人体重按 60 kg 计算, 根据每个方剂的生药量按照药理学人与大鼠换算公式 ($dB = dA \times KB/KA$, dA 为成人每天每公斤用药量, $KB = 0.71$,

KA = 0.11) 来折算, 分别以 4.20、3.23 和 0.97 g·kg⁻¹ 给药量灌胃给药, 模型组灌胃等剂量的生理盐水, 每日 1 次, 连续 2 周。正常组不予任何干预。

样品采集 末次给药后各组大鼠禁食不禁水, 用代谢笼采集大鼠新鲜粪便后立即放入灭菌的离心管中, -80 °C 冰箱保存, 以备肠道菌群分析。

指标检测及方法 造模期间每日观察大鼠神态、毛色、排泄物性状及体重变化等。依照文献^[11]方法测定大鼠的腹泻指数, 腹泻指数=稀便率×稀便级。稀便级数分级方法: 以稀便污染滤纸形成污迹面积的大小定级, 分为 4 级: 1 级为污染直径 < 1 cm, 2 级污染直径 1.0~1.9 cm, 3 级污染直径 2~3 cm, 4 级污染直径 > 3 cm。

肠道敏感性评估 采用文献^[12]方法用腹壁撤退反射 (abdominal with drawal reflex, AWR) 评分判断。分别于造模前 (第 0 周)、造模结束后 (第 4 周) 和给药结束后 (第 6 周) 3 个时间点对各组大鼠进行 AWR 评分。

结肠组织形态学变化 各组大鼠在实验结束后第 2 天, 用 10% 水合氯醛 (7 mL·kg⁻¹) 腹腔注射麻醉后, 取距肛门 8 cm 处结肠组织, 于 4% 多聚甲醛中固定 48 h 以上, 蒸馏水冲洗, 梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋、切片、HE 染色, 光镜下观察结肠病理学变化。

测序实验流程 利用 DNA 提取试剂盒依照试剂盒使用说明书步骤提取大鼠各粪便样本的基因组 DNA。将所提取的 DNA 样本进行细菌的 16S 核糖体 RNA 基因的 V3~V4 可变区域的 PCR 扩增 (扩增条件为: a. 95 °C 解链 3 min; b. 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 25 个循环; c. 72 °C 延伸 10 min), 测序区域为 338F_806R, 引物设计为 338F 5'-ACTCCTACGGGAG GCAGCAG-3' 和 806R 5'-GGACTACHVGGGTWTC TAAT-3', 并且分别给每个样本加上 8 bp 的标签序列。每个样品均做 3 次重复, PCR 反应体系共 20 μL, 包括 5×FastPfu Buffer 4 μL, 2.5 mmol·L⁻¹ dNTPs 2 μL, 引物 (5 μmol·L⁻¹) 各 0.8 和 0.4 μL 的 FastPfu Polymerase, BSA 0.2 μL 和 Template DNA 10 ng。将 PCR 产物用 Quanti Fluor™-ST 蓝色荧光定量系统进行检测定量, 之后按照测序量要求进行混合。

根据 Illumina MiSeq 测序平台的标准流程进行双末端测序。原始数据提交到 NCBI 数据中心的 Sequence Read Archive (SRA) 数据库。将成对的 reads 拼接成一条序列, 优化数据后采用贝叶斯算法 (RDP classifier) 进行 OTU (97% 相似水平) 聚类分析, 对多样本的群落组成进行多元分析和差异显著性检验等研究^[13]。

统计学方法 所有数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表

示, 采用 SPSS 20.0 统计软件分析。数据符合正态分布且方差齐时采用单因素方差分析, 否则用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 一般情况

造模前, 各组大鼠反应正常。造模后, 模型大鼠出现精神倦怠、喜扎堆、躲避畏惧、反应迟钝、尿量增多、大便溏或软粒状且肛门口有粪便附着, 体重下降、进食减少等特征, 且与正常组比较, 模型组大鼠的腹泻指数明显增加 ($P < 0.05$)。给药后, 各给药组与模型组比较, 腹泻指数均减小, 且以四神丸全方组效果最明显 ($P < 0.05$), 与二神丸和五味子散呈协同作用有关。

2 肠道敏感性评估

造模前, 大鼠的 AWR 评分为 1 mL: 1.10±0.32; 1.5 mL: 1.70±0.48; 2 mL: 2.50±0.53。造模后, 与正常组比较, 模型组大鼠 AWR 评分明显增加 [1 mL: 1.20±0.42; 1.5 mL: 2.30±0.48 ($P < 0.05$); 2 mL: 3.00±0.47 ($P < 0.05$)], 肠道痛阈降低, 大鼠肠道敏感性增加。给药后, 各给药组与模型组比较, 肠道敏感性均有所下降, 且全方组下降最显著 ($P < 0.05$), 疗效最好, 二神丸和五味子散组呈协同作用。见表 1。

Table 1 Abdominal with drawal reflex (AWR) in each group (two weeks of administration). $n = 9$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs control; $\Delta P < 0.05$ vs model. SSW: Sishen Wan group; ESW: Er Shen Wan group; WWZS: Wuweizisan group

Group	1 mL	1.5 mL	2 mL
Control	1.22 ± 0.44	2.00 ± 0.50	2.56 ± 0.53
Model	1.44 ± 0.53	2.44 ± 0.53	3.33 ± 0.50*
SSW	1.33 ± 0.50	2.33 ± 0.50	2.89 ± 0.33 Δ
ESW	1.44 ± 0.53	2.33 ± 0.50	3.11 ± 0.33
WWZS	1.33 ± 0.50	2.33 ± 0.50	3.22 ± 0.44

3 病理学指标

肉眼观察各组大鼠结肠组织均正常, 未见组织损伤。结肠组织 HE 染色结果如图 1 所示, 正常组结肠标本表面绒毛整齐完整, 上皮细胞连接紧密, 黏膜下血管正常, 腺体结构排列规则, 肌层无异常; 模型组结肠标本表面绒毛完整, 未见溃疡及黏膜增厚, 偶见黏膜下层血管轻度扩张, 可见少量炎症细胞浸润, 肌层无异常, 未见有病理学改变, 与相关文献^[14]报道一致; 四神丸组结肠标本表面绒毛整齐完整, 上皮细胞连接紧密, 黏膜下血管正常, 腺体结构排列规则, 未见炎症细胞浸润, 未见充血水肿, 肌层无异常; 二神丸组和五味子散组的结肠标本表面绒毛整齐完整, 上皮细胞连接紧密, 黏膜下血管正常, 腺体结构排列规则, 炎症细胞偶见, 未见

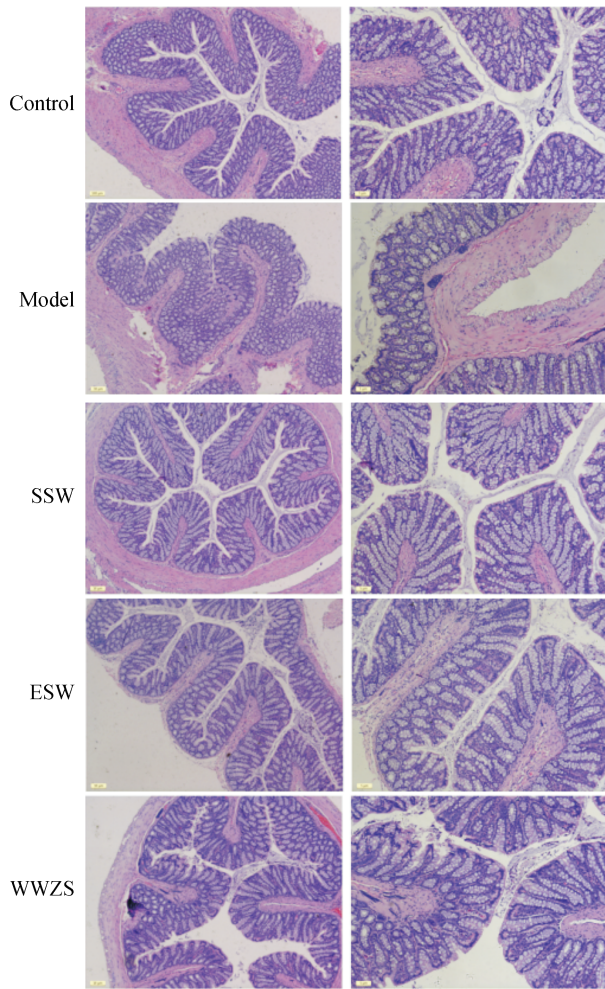


Figure 1 Representative H&E-stained colorectum sections (the left and right are 10×5 and 10×10 magnification, respectively) in five groups

充血水肿, 肌层无异常。

4 分类学分析

操作分类单元 (operational taxonomic units, OTU) 是在系统发生学中, 人为给某一个分类单元设置的统一标志。Rank-abundance 曲线是统计每个样本中, 每

个 OTU 所含的序列数, 用来解释菌群丰度和物种均匀度。如图 2 所示, 模型组在横轴上的范围最小, 其物种丰度最低, 提示造模干扰了肠道菌群的丰度。四神丸组在横轴上的范围最大, 说明四神丸能显著恢复肠道物种的丰度, 同时说明二神丸和五味子散组在增加肠道物种丰度上呈协同作用。

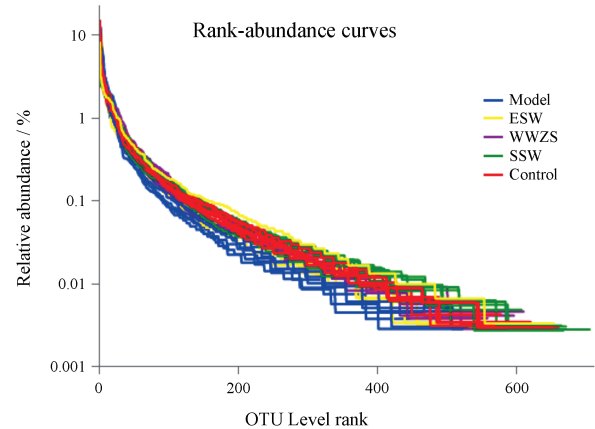


Figure 2 Rank-abundance curve

5 Pan/Core 物种分析

Pan/Core 物种分析用来判断样本量是否充足以及评估环境中总物种丰富度和核心物种数, pan OTU 为共有的 OTU 的并集数, core OTU 为共有 OTU 的交集数。图 3A、B 中随着样本量增加, 曲线趋于平滑, 说明各组的样本量充足。模型组的曲线均位于最下端, 其总物种丰富度和核心物种数最低。各给药组均有恢复肠道物种数的疗效且以全方组的效果最好, 二神丸和五味子散呈协同作用。

6 菌群的多样性分析

通过样本的 Alpha 多样性来对菌群进行分析。Sobs、heip 和 invsimpson 指数分别用来反映群落的丰富度、均匀度和多样性。如表 2 所示, 模型组较正常组群落的丰富度、均匀度和多样性均降低 ($P < 0.05$), 各给

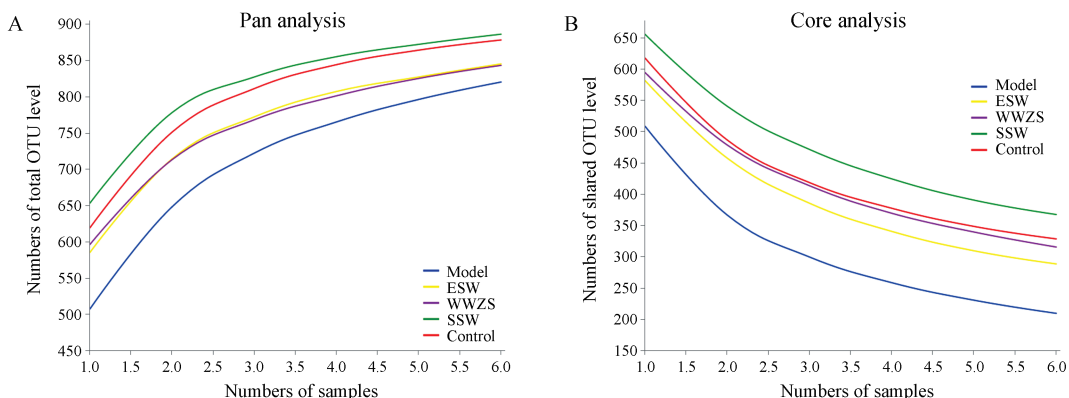


Figure 3 Pan species (A) and Core species (B) analysis curve

Table 2 The rat gut microbiota diversity indexes in various groups. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs control; $\Delta P < 0.05$ vs model; $\blacktriangle P < 0.05$ vs SSW

Group	Sobs	Heip	Invsimpson	Coverage
Control	618.50 ± 35.46	0.16 ± 0.01	38.59 ± 7.33	0.99 ± 0.000 92
Model	508.17 ± 23.26*	0.13 ± 0.03*	29.02 ± 8.66	0.99 ± 0.001 28
SSW	657.67 ± 34.96 Δ	0.17 ± 0.03 Δ	45.90 ± 16.55	0.99 ± 0.000 99
ESW	583.50 ± 37.91 Δ \blacktriangle	0.15 ± 0.04	34.65 ± 13.94	0.99 ± 0.000 57
WWZS	593.33 ± 36.95 Δ \blacktriangle	0.18 ± 0.02 Δ	45.69 ± 7.64 $\#$	0.99 ± 0.000 83

药组较模型组均有恢复作用 ($P < 0.05$)。Coverage 指数是指各样品文库的覆盖率, 各组样本的数值均在 0.9 以上, 说明样本序列中未被测出的概率较小。PCA 主成分分析和 PCoA 主坐标分析结果显示, 5 组菌群差异明显 (图 4A、B)。

基于 Beta 多样性距离的非度量多维尺度分析 (NMDS), 通过点与点间的距离体现对不同样本间的差异程度, 各组组间样本未重叠 (图 4C), 表明组间肠道菌群构成有明显差异。

7 菌群的丰度变化

7.1 造模对大鼠肠道菌群的影响 门水平: 与正常组相比, 模型组在变形菌门 (Proteobacteria) 和放线菌门 (Actinobacteria) 丰度显著增加 ($P < 0.05$)。属水平: 与正常组相比, 模型组在韦荣球菌属 (norank_f_Erysipelotrichaceae) 和支原体属 (Allobaculum) 显著增加 ($P < 0.05$), 在普雷沃氏菌属 (Prevotellaceae_Ga6A1_group、Prevotellaceae_NK3B31_group) 和 Romboutsia 显著减少 ($P < 0.05$)。见图 5A、B 和表 3。

7.2 四神丸、二神丸和五味子散对大鼠肠道菌群的影响 门水平: 与模型组相比, 四神丸组在变形菌门 (Proteobacteria) 显著减少 ($P < 0.05$), 在 unclassified_k_norank 显著增加 ($P < 0.05$)。二神丸组在变形菌门 (Proteobacteria) 和放线菌门 (Actinobacteria) 显著减少 ($P < 0.05$), 在 unclassified_k_norank 和迷踪菌门 (Elusimicrobia) 显著增加 ($P < 0.05$)。五味子散组在变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria) 和蓝细菌门 (Cyanobacteria) 显著减少 ($P < 0.05$), 在柔膜菌门 (Tenericutes) 和 unclassified_k_norank 显著增加 ($P < 0.05$)。属水平: 与模型组相比, 四神丸组在支原体属 (Allobaculum) 显著减少 ($P < 0.05$), 在梭菌属 (Clostridium_sensu_stricto_1)、Turicibacter 和 Romboutsia 显著增加 ($P < 0.05$)。二神丸组在韦荣球菌属 (norank_f_Erysipelotrichaceae) 和支原体属 (Allobaculum) 显著减少 ($P < 0.05$)。在普雷沃氏菌属 (Prevotellaceae_NK3B31_group、Prevotellaceae_Ga6A1_group 和 unclassified_f_Prevotellaceae)、Romboutsia 和 Turicibacter 显著增加

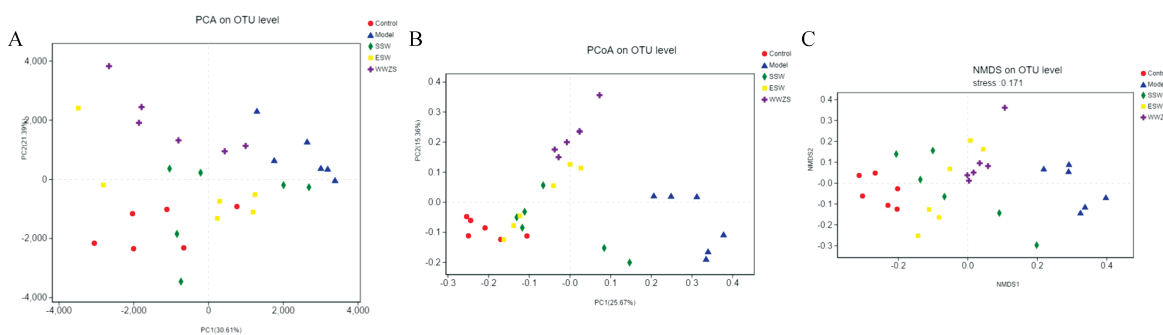


Figure 4 Multiple samples of PCA analysis (A), PCoA analysis (B) and NMDS analysis (C)

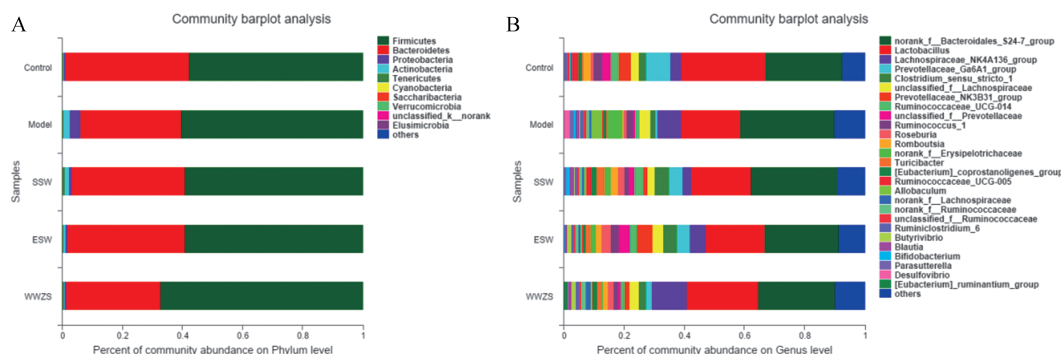


Figure 5 Bar graph of microbial community ratio at Phylum level (A) and Genus level (B)

Table 3 The relative abundance of rats intestinal flora in various groups. $n = 6, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs control; $\Delta P < 0.05$ vs model

No	Species	Taxonomy	Control	Model	SSW	Trend
1	Firmicutes	Phylum	0.573 1 ± 0.112 1	0.597 0 ± 0.081 8	0.589 3 ± 0.0485	↑ ↓
2	Bacteroidetes	Phylum	0.414 5 ± 0.109 1	0.342 0 ± 0.087 2	0.3760 ± 0.038 4	↓ ↑
3	Proteobacteria	Phylum	0.005 4 ± 0.004 0	0.035 2 ± 0.001 2*	0.009 4 ± 0.006 3 Δ	↑ ↓
4	Actinobacteria	Phylum	0.002 5 ± 0.000 8	0.021 7 ± 0.007 0*	0.015 4 ± 0.016 3	↑ ↓
5	Tenericutes	Phylum	0.002 9 ± 0.000 9	0.003 2 ± 0.001 5	0.008 6 ± 0.007 5	↑ ↓
6	Cyanobacteria	Phylum	0.000 5 ± 0.000 4	0.000 5 ± 0.000 3	0.000 5 ± 0.000 6	--
7	Saccharibacteria	Phylum	0.000 4 ± 0.000 3	0.000 4 ± 0.000 4	0.000 4 ± 0.000 4	--
8	Lactobacillus	Genus	0.280 0 ± 0.088 6	0.191 6 ± 0.067 8	0.199 7 ± 0.095 2	↓ ↑
9	Lachnospiraceae_NK4A136_group	Genus	0.033 6 ± 0.023 3	0.074 2 ± 0.049 9	0.028 1 ± 0.022 8	↑ ↓
10	Prevotellaceae_Ga6A1_group	Genus	0.077 8 ± 0.045 9	0.007 1 ± 0.004 4*	0.053 6 ± 0.000 3	↓ ↑
11	Clostridium_sensu_stricto_1	Genus	0.024 9 ± 0.009 6	0.018 0 ± 0.007 4	0.046 8 ± 0.015 1 Δ	↓ ↑
12	Erysipelotrichaceae	Genus	0.001 2 ± 0.001 3	0.049 3 ± 0.027 9*	0.019 7 ± 0.025 7	↑ ↓
13	Ruminococcus_1	Genus	0.028 6 ± 0.004 4	0.021 6 ± 0.008 7	0.015 4 ± 0.010 5	↓ ↓
14	Prevotellaceae_NK3B31_group	Genus	0.040 9 ± 0.050 7	0.001 7 ± 0.001 4*	0.015 0 ± 0.015 0	↓ ↑
15	Romboutsia	Genus	0.022 8 ± 0.007 5	0.006 6 ± 0.001 6	0.025 3 ± 0.006 5 Δ	↓ ↑
16	Allobaculum	Genus	0.000 9 ± 0.001 0	0.037 1 ± 0.019 6*	0.007 4 ± 0.007 5 Δ	↑ ↓
17	Turicibacter	Genus	0.003 6 ± 0.002 2	0.005 4 ± 0.002 2	0.027 7 ± 0.016 8 Δ	↑ ↑
18	Blautia	Genus	0.001 1 ± 0.000 5	0.007 5 ± 0.005 0	0.014 8 ± 0.020 0	↑ ↑
19	Desulfovibrio	Genus	0.001 6 ± 0.000 7	0.019 6 ± 0.014 1	0.001 0 ± 0.000 6	↑ ↓
20	Parasutterella	Genus	0.002 3 ± 0.001 7	0.010 5 ± 0.004 2	0.007 1 ± 0.007 4	↑ ↓

($P < 0.05$)。五味子散组在韦荣球菌属 (norank_f_Erysipelotrichaceae)、支原体属 (Allobaculum) 和瘤胃球菌属 (Ruminococcus_1) 显著减少 ($P < 0.05$), 在罗斯氏菌属 (Roseburia)、毛螺菌属 (norank_f_Lachnospiraceae) 和 Romboutsia 显著增加 ($P < 0.05$)。见图 5A、B 和表 3。

7.3 四神丸、二神丸和五味子散对大鼠肠道菌群的影响比较 四神丸组、二神丸组和五味子散组在放线菌门 (Actinobacteria)、Lachnospiraceae_NK4A136_group、普雷沃氏菌属 (unclassified_f_Prevotellaceae) 和瘤胃球菌属 (Ruminococcaceae_UCG-014) 有显著差异, 见图 6A、B 和表 4。说明各给药组对 IBS-D 大鼠肠道菌群的影响各不相同, 二神丸和五味子散组呈协同作用。

7.4 菌群的统计学分析 LEfSe 是一种用于发现高维生物标识和揭示基因组特征的软件, 用于区别两个或两个以上生物条件, 实现多个分组之间的比较。由分

析可知, 正常组在普雷沃氏菌科 (f_Prevotellaceae 和 g_Prevotellaceae_Ga6A1_group)、瘤胃菌科 (g_Ruminococcaceae_UCG_005) 丰度较高; 模型组在 f_Erysipelotrichaceae、芽胞菌 (c_Erysipelotrichia)、o_Erysipelotrichales、g_norank_f_Erysipelotrichaceae、别样棒菌属 (g_Allobaculum) 和变形菌纲 (p_Proteobacteria) 丰度较高。四神丸组在 g_Turicibacter、消化链球菌科 (f_Peptostreptococcaceae) 和 g_Romboutsia 丰度较高。二神丸组 (ESW) 在普雷沃氏菌科 (g_Prevotellaceae_NK3B31_group)、梭菌属 (g_Clostridium_sensu_stricto_1 和 f_Clostridiaceae_1) 丰度较高。五味子散组在毛螺菌科 (g_Lachnospiraceae_NK4A136_group)、丁酸弧菌属 (g_Butyrvibrio)、真细菌 (g_Eubacterium_ruminantium_group) 和毛螺菌科 (g_norank_f_Lachnospiraceae) 丰度较高。

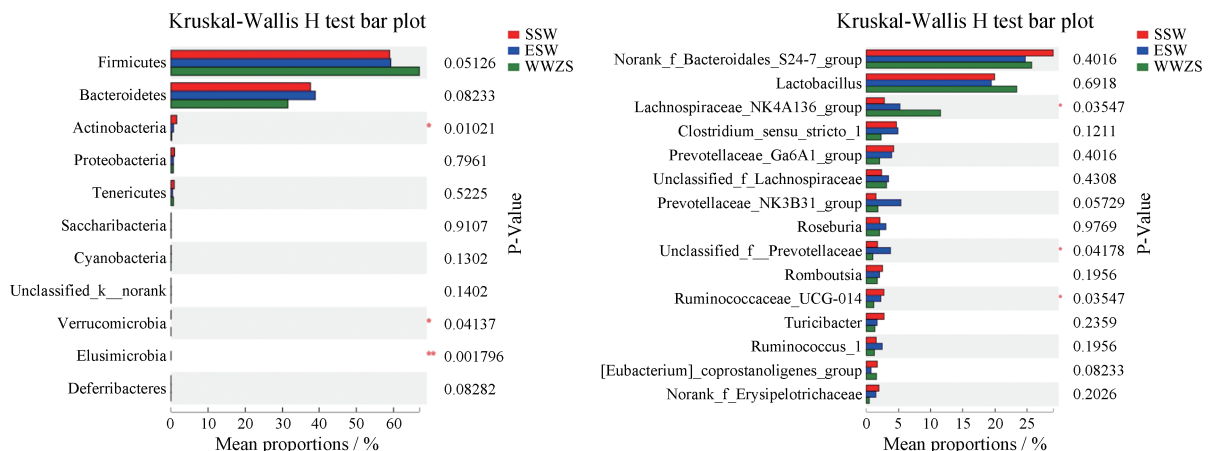


Figure 6 Comparative bar graph of microorganisms in SSW, ESW and WWZS at Phylum level (A) and Genus level (B)

Table 4 The relative abundance of rats intestinal flora in SSW, ERW and WWZS. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs SSW

No	Species	Taxonomy	SSW	ESW	WWZS
1	Firmicutes	Phylum	0.589 3 ± 0.048 5	0.592 3 ± 0.061 5	0.669 5 ± 0.062 4
2	Bacteroidetes	Phylum	0.376 0 ± 0.038 4	0.389 0 ± 0.064 4	0.315 1 ± 0.061 0
3	Actinobacteria	Phylum	0.015 4 ± 0.016 3	0.006 7 ± 0.003 9*	0.001 9 ± 0.000 8*
4	Bacteroidales_S24-7_group	Genus	0.290 7 ± 0.084 4	0.247 3 ± 0.044 0	0.257 3 ± 0.034 9
5	Lactobacillus	Genus	0.199 7 ± 0.095 2	0.194 5 ± 0.105 7	0.234 0 ± 0.087 9
6	Lachnospiraceae_NK4A136_group	Genus	0.028 1 ± 0.022 8	0.052 4 ± 0.004 7*	0.066 9 ± 0.000 4*
7	Prevotellaceae	Genus	0.017 5 ± 0.001 8	0.037 6 ± 0.003 0*	0.010 3 ± 0.005 7*
8	Ruminococcaceae_UCG-014	Genus	0.027 4 ± 0.002 9	0.022 3 ± 0.009 8*	0.011 7 ± 0.002 5*

讨论

四神丸是治疗脾肾阳虚泄泻的名方,临床应用四神丸治疗 IBS-D 取得了显著疗效^[15]。采用番泻叶联合腺嘌呤灌胃造模后,大鼠的各项指标均符合 IBS-D 大鼠模型特征^[16],说明造模成功。各给药组均能改善大鼠腹泻、肠道高敏感性等症状,且以四神丸全方组效果最好,二神丸和五味子散呈协同作用。

肠道菌群与 IBS-D 的关系已成为当下研究热点^[17-20]。肠道微生物群落结构柱形图显示了微生物的种类和其相对丰度,IBS-D 大鼠的肠道菌群组成结构和丰度与正常组大鼠存在显著差异,说明 IBS-D 的发病可能与肠道菌群失调有关。放线菌门中大部分是腐生菌和致病菌^[21,22],IBS-D 大鼠肠内其丰度较正常组显著增加。韦荣球菌产生的内毒素能够刺激诱导人和鼠的细胞因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的释放,引起炎症反应^[23,24],IBS-D 大鼠出现的炎症反应可能与其丰度增加有关。支原体属是有致病特性,IBS-D 大鼠肠道内其丰度显著增加。普雷沃氏菌属是一种多形态杆菌,具有维持肠道正常生理等功能^[25],IBS-D 大鼠肠道内其丰度显著减少,说明造模影响了大鼠的正常生理代谢。

四神丸可能通过下调变形菌门和支原体属,同时上调梭菌属、Turicibacter 和 Romboutsia 的丰度来发挥治疗作用。变形菌门包括很多病原菌,其丰度的增加会引起肠道菌群失调,四神丸下调的脱硫弧菌属属于其中一类,其在肠道内的丰度会影响炎症因子水平^[26-28]。梭菌属能够促进肠黏膜的生长增殖^[29-31],四神丸可能通过上调其丰度来发挥保护肠黏膜的功能。

实验研究结果表明肠道菌群变化可能是四神丸发挥药效的途径,其通过增加肠道内益生菌丰度,减少有害菌丰度,来调节肠道微生态的平衡,发挥治疗 IBS-D 的作用,且四神丸全方组的疗效最显著,说明二神丸和五味子散组之间呈协同作用。近年来有很多研究将益生菌或益生元制剂用于 IBS-D 患者的治疗^[6],但由于目前其所含菌种有限,无法完全恢复 IBS-D 患者的正常肠道微生态。这提示,可以将四神丸和微生物制剂联合应用,为临床用药提供新思路。

References

- [1] Drossman DA. Functional gastrointestinal disorders: history, pathophysiology, clinical features, and Rome IV [J]. Gastroenterology, 2016, 150: 1262-1279. e2.
- [2] Lacy BE, Mearin F, Chang L, et al. Bowel disorders [J]. Gastroenterology, 2016, 150: 1393-1407. e5.
- [3] Quigley EM, Fried M, Gwee KA, et al. World gastroenterology organisation global guidelines irritable bowel syndrome: a global perspective update september 2015 [J]. J Clin Gastroenterol, 2016, 50: 704-713.
- [4] Chen F, Zhou XL. Efficacy of flupentixol and melitracen combined with pinaverium bromide in irritable bowel syndrome [J]. Chin J Biochem Pharm (中国生化药物杂志), 2016, 36: 86-88.
- [5] Xu HY, Wang YL, Wang DF, et al. Effect of Huangqin Tang on the gut microbiota in rats with ulcerative colitis model determined by high-throughput sequencing [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 1673-1682.
- [6] Wang ZH, Kuang WC, Hu JJ, et al. Research of Bifidobacterium lactobacillus Sanlian living bacterium in treating alteration of intestinal flora [J]. Shenzhen J Integrat Tradit Chin West Med (深圳中西医结合杂志), 2016, 26: 17-19.
- [7] Zhu XW, Liu ZB, Niu WM, et al. Effects of electroacupuncture at ST25 and BL25 in a *Sennae*-induced rat model of diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome [J]. Acupunct Med, 2017, 35: 216-223.
- [8] Fu XQ, Lin RQ, Wu YM, et al. Biochemical study on models of kidney-YANG deficiency replicated by adenine in rats of chronic renal failure [J]. J Fujian Coll Tradit Chin Med (福建中医学院学报), 2003, 13: 22-24.
- [9] Zhang CM, Liu L, Wang JH, et al. Treatment of spleen-kidney Yang deficiency syndrome of diarrhea type irritable bowel syndrome [J]. Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊), 2017, 35: 1376-1378.
- [10] Qu CJ, Lin YR, Xia SJ, et al. Comparative study on immunology of purging action of Radix Sophorae Flavescentis in two types spleen-deficiency model [J]. Liaoning J Tradit Chin Med (辽宁中医杂志), 1999, 26: 133-134.
- [11] Zhao Y, Luo DN, Chen Y, et al. Dose-effect and time-effect relationship of chronic restraint stress combined with senna

- extract gavage in inducing diarrhea-predominant irritable bowel syndrome in rats [J]. *World Chin J Digestol* (世界华人消化杂志), 2017, 25: 1360-1367.
- [12] Yu YB, Zuo XL, Zhao QJ, et al. Brain-derived neurotrophic factor contributes to abdominal pain in irritable bowel syndrome [J]. *Gut*, 2012, 61: 685-694.
- [13] Amato KR, Yeoman CJ, Kent A, et al. Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes [J]. *ISME J*, 2013, 7: 1344-1353.
- [14] Zhao YP, Tang XD, Bian ZX, et al. Preliminary study of establishing and assessing IBS-D model rats of Gan stagnation and Pi deficiency syndrome [J]. *Chin J Integrat Tradit West Med* (中国中西医结合杂志), 2013, 33: 1507-1514.
- [15] Zhou F, Liu DY, Zhao HM. Overview of Sishen Pill in the treatment of gastrointestinal diseases [J]. *Jiangxi J Tradit Chin Med* (江西中医药), 2011, 42: 61-63.
- [16] An R, Han PY, Xu QY, et al. Establishment and evaluation of animal model of irritable bowel syndrome [J]. *J Xinxiang Med Univ* (新乡医学院学报), 2016, 33: 434-439.
- [17] Biedermann L, Rogler G. The intestinal microbiota: its role in health and disease [J]. *Eur J Pediat*, 2015, 174: 151-167.
- [18] Chung CS, Chang PF, Liao CH, et al. Differences of microbiota in small bowel and faeces between irritable bowel syndrome patients and healthy subjects [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2016, 51: 410-419.
- [19] Fan LZ. The curative effect of pinaverium combined with ataining on diarrhea IBS [J]. *J Baotou Med Coll* (包头医学院学报), 2017, 33: 61-62.
- [20] Su DM, Li JX, Liu XP. Study on the efficacy and mechanism of ginger moxibustion in treating diarrhea-predominant irritable bowel syndrome by changes of intestinal flora [J]. *Chin J Integrat Tradit West Med Digest* (中国中西医结合消化杂志), 2018, 26: 148-151.
- [21] Derrien M, Van Baarlen P, Hooiveld G, et al. Modulation of mucosal immune response, tolerance, and proliferation in mice colonized by the mucin-degrader *Akkermansia muciniphila* [J]. *Front Microbiol*, 2011, 2: 166.
- [22] Ganesh BP, Klopffleisch R, Loh G, et al. Commensal *Akkermansia muciniphila* exacerbates gut inflammation in *Salmonella typhimurium*-infected gnotobiotic mice [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e74963.
- [23] Delwiche EA, Pestka JJ, Tortorello ML. The veillonellae: gram-negative Cocci with a unique physiology [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1985, 39: 175-193.
- [24] Matera G, Muto V, Vinci M, et al. Receptor recognition of and immune intracellular pathways for *Veillonella parvula* lipopolysaccharide [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2009, 16: 1804-1809.
- [25] Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota--masters of host development and physiology [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11: 227-238.
- [26] Postgate JR. *The Sulphate-Reducing Bacteria* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1979.
- [27] Gibson GR. Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria [J]. *J Appl Bacteriol*, 1990, 69: 769-797.
- [28] Gibson GR, Macfarlane GT, Cummings JH. Occurrence of sulphate-reducing bacteria in human faeces and the relationship of dissimilatory sulphate reduction to methanogenesis in the large gut [J]. *J Appl Bacteriol*, 1988, 65: 103-111.
- [29] Liu H, Yang QJ. Hyperbaric oxygen combined therapy for gas gangrene in 60 cases [J]. *Chin J Nosocomiol* (中华医院感染学杂志), 2006, 16: 1127-1128.
- [30] Kelly D, Campbell JI, King TP, et al. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR- γ and RelA [J]. *Nat Immunol*, 2004, 5: 104-112.
- [31] Duncan SH, Louis P, Flint HJ. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 5810-5817.