国家项目点击

DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.05.006

肝肺并治方干预溃疡性结肠炎大鼠肠道菌群的研究

杨丽[1,2],李忠卓[2],臧思源[2],张继伟[1],左韬[1,3]
(1.辽宁中医药大学,辽宁 沈阳 110847;2.辽宁中医药大学附属第三医院,辽宁 沈阳 110000;
3.辽宁中医药大学附属第二医院,辽宁 沈阳 110034)

摘要:目的 研究肝肺并治方对溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis,UC)大鼠肠道菌群的影响。方法 SD大鼠30只随机分组,分为肝肺并治方高剂量组(A)、肝肺并治方中剂量组(B)、肝肺并治方低剂量组(C)、模型组(D)和空白组(E),每组6只。采用三硝基苯磺酸(Trinitrobenzenesulfonic acid solution, TNBS)配合乙醇建立UC大鼠模型。不同干预因素灌胃后取大鼠肠内容物,采用16S rRNA方法进行菌群测序。结果 各组大鼠肠内容物门水平优势菌种为厚壁菌(Firmicutes)和拟杆菌(Bacteroidetes),造模后厚壁菌数量降低,而拟杆菌数量增加,肝肺并治方干预可增加厚壁菌数量,降低杆菌数量,其中中药中剂量组效果最为明显。α多样性的检测,测序深度逐渐增加,对应的曲线逐渐趋于平缓;β多样性的距离矩阵与PCoA分析图中B组与E组的差异最小。各组大鼠肠内容物组成,门水平、种水平、属水平中药中剂量组与空白组最为相近,放线菌门(p__Actinobacteria)在组间存在显著差异。结论 肝肺并治方可纠正溃疡性结肠炎大鼠的肠道菌群分布,使其趋于正常大鼠菌群,其中肝肺并治中剂量组效果最为明显。

关键词:肝肺并治方;溃疡性结肠炎;肠道菌群
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)05-0028-11

Study on Gut Microbiota of Rats with Ulcerative Colitis Treated with Ganfei Bingzhi Formula(肝肺并治方)

YANG Li[1,2],LI Zhongzhuo[2],ZANG Siyuan[2],ZHANG Jiwei[1],ZUO Tao[1,3]
(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine,Shenyang 110847,Liaoning,China;
2. Third Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine,Shenyang 110000,Liaoning,China;
3. Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine,Shenyang 110034,Liaoning,China)

Abstract:*Objective* To study the effect of Ganfei Bingzhi Formula(肝肺并治方)on gut microbiota of rats with ulcerative colitis. *Method* Thirty SD rats were randomly divided into Ganfei Bingzhi Formula high dose group(A),Ganfei Bingzhi Formula medium dose group(B),Ganfei Bingzhi Formula low dose group(C),model group(D)and blank group(E),with 6 rats in each group. A rat model of UC was established by using trinitrobenzenesulfonic acid solution(TNBS)/ethanol method. After gavage with different intervention factors,the intestinal contents of rats were taken out and the bacterial population was sequenced using 16S rRNA method. *Result* The dominant bacteria in the intestinal contents of rats in each group were Firmicutes and Bacteroidetes. After modeling,the number of Firmicutes decreased,while the number of Bacteroidetes increased. Intervention with Ganfei Bingzhi Formula can increase the number of Firmicutes and reduce the number of Bacteroidetes. The effect of the medium dose group was the most significant. The sparse curve of α-diversity tended to flatten out as the sequencing depth increased. The difference between the medium dose group and the blank group in the PCoA analysis chart and the distance matrix of β-diversity were the smallest. The composition of intestinal contents in the middle dose group was the most similar to that of the blank group in phylum level,species level and genus level. There was a significant difference in the phylum of actinomycetes among the groups. *Conclusion* Ganfei Bingzhi Formula can correct the distribution of intestinal microbiota in rats with UC,making it tend to the normal gut microbiota. Among them,the effect of the medium dose group is most obvious.

Keywords:Ganfei Bingzhi Formula(肝肺并治方);ulcerative colitis;gut microbiota

溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis,UC)又称特发性溃疡性结肠炎,或慢性非特异性溃疡性结肠炎,主要表现为:腹泻、腹痛、血便或黏液脓血便,严重者伴有乏力、消瘦、发热等全身症状,其病程迁延反复[1-3]。现代研究发现,除免疫、遗传、感染等因素,肠道微生态失调是UC发病的重要机制[4]。在UC患者的不同时期,肠道菌群都会出现不同程度的整体受损,虽然受地理位置、饮食差异、个体情况、实验操作等因素影响,各种实验UC患者所培养、检测的肠道微生态菌属不尽相同,但其肠道微生态的失调程度与疾病的活动度均呈正相关[5-7]。

中医药治疗UC的历史悠久,可以归入中医的"泄泻""肠风""肠澼""大瘕泄""痢疾""下利""滞下"等范畴。中医药治疗大便稀溏、脓血便、赤白痢的方药均可用于治疗UC,且不良反应小,适合长期治疗,是缓解UC发作期的最安全有效的方法[8]。肝肺并治方源于唐宗海的《血证论》,唐氏提出了痢病

基金项目:国家自然科学基金项目(82074449);辽宁省科学技术厅博士科研启动基金计划项目(2021-BS-177);辽宁省教育厅面上项目(LJKZ0891)
作者简介:杨丽(1981-),女,辽宁鞍山人,主任医师,博士,研究方向:中医药防治肛肠病及中医脏象基础理论。
通讯作者:左韬(1967-),女,辽宁沈阳人,主任医师,博士研究生导师,博士,研究方向:中西医结合治疗疑难眼病。E-mail:ykzt208@163.com。

“虽关于脾胃,而要以肝肺为主”,其病因为“肺气传送太力,故暴注大肠;肝气郁而不疏,故肛门闭塞,欲便不便,而为逼胀”[9](《血证论·便脓》),肝疏泄太过,引起暴注里急;肺金收涩,滞塞不畅,引起后重下利是痢病的主要病因。治疗上应用“和肝调肺”之法开肺气、清肝火,从而“止奔迫”“解郁闭”,并以白头翁汤加石膏、知母、杏仁、桔梗、枳壳、槟榔、柴胡、麦芽、当归、白芍、甘草组成肝肺并治之方。

肝肺并治方作为唐氏之经典方,治疗 UC 临床疗效确切。本研究拟通过肝肺并治方干预 UC 大鼠,观察大鼠肠道菌群的变化,验证 UC 的发病与肠道菌群的相关性,而肝肺并治方可通过调节肠道菌群进而治疗 UC。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 SD 大鼠 30 只,雄性,8~12 周龄,体质量(200±20)g。购自辽宁长生生物科技股份有限公司[许可证号:SCXK(辽)2020-0001],辽宁中医药大学动物实验中心 SPF 级实验室内饲养。

1.1.2 实验药物 肝肺并治方组成:白头翁 15 g,黄连 6 g,黄柏 12 g,秦皮 12 g,石膏 6 g,知母 9 g,杏仁 15 g,桔梗 12 g,枳壳 9 g,槟榔 9 g,柴胡 9 g,麦芽 12 g,当归 12 g,白芍 9 g,甘草 9 g。中医饮片购自辽宁中医药大学附属第三医院,并由辽宁中医药大学附属第三医院煎药室煎煮。

1.1.3 主要试剂 三硝基苯磺酸(Trinitrobenzenesulfonic acid solution, TNBS)(SIGMA,货号:P2297-10ML),无水乙醇(罗恩,货号:R003457-500ML),乌拉坦(国药集团化学试剂有限公司,货号:U0202-500G),Agarose(Invitrogen,货号:75510-019),Marker(Takara,货号:DL2000),TAE(Invitrogen,货号:AM9870),Q5® High-Fidelity DNA Polymerase(NEB,货号:M0491L),Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit(Invitrogen,货号:P7589)。

1.1.4 主要仪器 Nanodrop(Thermo Scientific,型号:NC2000),电泳仪(北京六一,型号:DYY-6C),凝胶成像系统[北京百晶,型号:BG-gdsAUTO(130)],PCR 扩增仪(ABI,型号:2720),酶标仪(BioTek,FLX800T)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 30 只 SD 大鼠按体质量分层随机分组,分为肝肺并治方高剂量组(A)、肝肺并治方中剂量组(B)、肝肺并治方低剂量组(C)、模型组(D)和空白组(E),每组 6 只。

1.2.2 造模方法 采用 TNBS 配比乙醇建立 UC 大鼠模型,此模型是目前研究 UC 较为理想的动物模型之一,造模方法简单可行,到目前为止,广泛地应用于 UC 的发病机制及药物治疗的研究中[10]。

SD 大鼠 30 只,适应性喂养 7 d,正常进水、进食。确定大鼠健康,全部禁食、不禁水 24 h。造模组大鼠予 20% 乌拉坦腹腔注射,药物剂量按照 80 mg/100 g 计算,充分麻醉后,予以固定。将 5% TNBS 和 50% 乙醇按 1∶1 的体积比混匀,制成 TNBS/乙醇液备用。取一次性灌肠管 1 根,外涂少量液体石蜡以作润滑,从大鼠肛门逆行插入结肠内,深度约为 8.0 cm,按 TNBS 33 mg/kg 计算用量,将适量 TNBS/乙醇液通过灌肠管灌入肠内,取出输液管,医用棉签堵肛。将大鼠以身倾 45°,头部向下的姿势保持 5 min 后,再将其自然放平;空白组采用生理盐水灌肠,方法同造模组,均自然清醒。3 天后计算造模组大鼠疾病活动指数评分(Disease activity index, DAI)[11](见表 1),由动物体质量、粪便性状及便血情况 3 项指标评分之和的均值构成,即 DAI =(体质量下降分数 + 粪便性状分数 + 便血分数)/3,大于 2 分即为造模成功。确定造模成功第 2 日起对各组大鼠给药。

表 1 造模组大鼠 DAI 评分

体质量下降/(%)	大便性状	大便隐血/肉眼血便	评分
0 = <1%	正常	正常(-)	0
1% ~5%	非常软但成型	隐血阳性(+)	1
6% ~10%	半稀便	肉眼血便(++)	2
11% ~15%	稀便	肉眼血便(+++)	3
>15%	较重稀便	肉眼血便(>++++)	4

1.2.3 给药剂量与方法 所用药物剂量均经过人与大鼠的等效剂量换算。从造模成功开始,各组分别给予不同药物进行灌胃,1 次/d,共连续灌胃 14 d,所用灌胃药物及药量如下:A 组予肝肺并治方 3.2 g/(100 g·d)生药量;B 组予肝肺并治方 1.6 g/(100 g·d)生药量;C 组予肝肺并治方 0.8 g/(100 g·d)生药量,D 组及 E 组均给予生理盐水灌胃 2 mL/d。

1.2.4 标本采集 灌胃 14 d 后,各组大鼠腹腔分别注射 20% 乌拉坦麻醉。各组大鼠处死后,解剖腹腔,取大鼠肠内容物放入 5 mL 灭菌冻存管中,-80 ℃保存待用。

1.2.5 DNA 提取 粪便样本 DNA 提取使用 OMEGA 土壤 DNA 试剂盒(M5635-02)(OMEGA Bio-Tek, Norcross, GA, USA),按说明书操作。分别使用 NanoDrop NC2000 分光光度计(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)和琼脂糖凝胶电泳测量提取 DNA 的数量和质量。

1.2.6 16S rRNA 基因扩增测序 大鼠内容物的肠道菌群测序由沈阳墨轩科技有限公司完成,首先对细菌 16S rRNA 基因 V3-V4 区域进行 PCR 扩增,使用正向引物 338F(5′-ACCTACGGGAGGCAGCA-3′)和反向引物 806R(5′-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3′)。扩增结果进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,切取目的片段然后用 Axygen 凝胶回收试剂盒回收目的片段。利用 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit 对 PCR 产物在 Microplate reader(BioTek, FLx800)上进行定量,然后按照每个样品所需的数据量进行混样。

1.2.7 测序数据处理 采用 Illumina 平台对群落 DNA 片段进行双端(Paired-end)测序,测序原始数据以 FASTQ 格式保存。使用 QIIME2(2019.4)软件,调用 qiime cutadapt trim-paired 切除序列的引物片段,弃去未匹配引物的序列;然后通过 qiime dada2 denoise-paired 调用 DADA2 进行去引物、质控、去噪、拼接、去嵌合体。

1.2.8 统计学方法 计量资料应用 SPSS 23.0 软件处理,符合正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料两两比较采用 t 检验;不符合正态分布的计量资料以 M(P25, P75)表示,计量资料两两比较采用秩和检验,肠道菌群数据采用上海派森诺生物科技有限公司基因云平台进行统计分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

本研究对 30 份大鼠肠内容物样本进行了 16S 测序,各组大鼠肠内容物样本测序量统计见表 2,序列长度集中于 404~431 bp 之间(插页Ⅷ图 1)。各组大鼠肠内容物的共有 OTU 为 288 个,A 组独有的 OTU 数为 7566 个,B 组独有的 OTU 数为 5615 个,C 组独有的 OTU 数为 6379 个,D 组独有的 OTU 数为 6441 个,E 组独有的 OTU 数为 5038 个(插页Ⅷ图 2)。

2.1 物种组成分析

各组大鼠肠内容物门水平优势菌种为厚壁菌(Firmicutes)和拟杆菌(Bacteroidetes)(插页Ⅸ图 3),组内均值 B 组的优势菌种最接近 E 组水平(插页Ⅹ图 4),D 组的厚壁菌高于 E 组,拟杆菌低于 E 组。纲水平的优势菌种为梭菌纲(Clostridia)与拟杆菌纲(Bacteroidia)(插页Ⅸ图 3),组内均值也是 B 组的优

势菌种最接近 E 组水平。而其他 3 组水平基本持平(插页Ⅹ图 4)。目水平优势菌种为梭菌目(Clostridiales)与拟杆菌(Bacteroidales)(插页Ⅸ图 3),较其他 3 组而言 B 组的梭菌最接近 E 组水平(插页Ⅹ图 4)。

表 2 各组大鼠肠内容物样本序列量统计

样本 ID	输入数据	过滤	去噪	合并	去嵌合	单例
A1	83 946	75 604	71 771	58 805	41 076	39 720
A2	84 182	76 682	72 613	59 272	43 340	41 729
A3	78 055	71 295	68 157	56 141	41 881	40 877
A4	80 475	73 581	70 945	61 711	46 176	45 429
A5	83 440	76 570	73 276	63 972	46 898	46 075
A6	88 175	80 562	76 323	62 097	44 309	42 969
B1	82 681	75 682	72 275	61 187	43 545	42 539
B2	81 671	75 412	73 300	67 223	51 442	51 004
B3	84 723	77 653	74 461	64 050	48 174	47 345
B4	88 719	81 877	78 153	66 054	51 521	50 561
B5	83 958	77 997	75 600	68 502	54 341	53 776
B6	87 427	79 718	76 600	65 045	48 796	47 669
C1	89 235	81 385	78 193	66 365	47 245	46 081
C2	82 286	75 617	72 393	62 453	47 061	46 285
C3	77 567	71 218	68 307	58 528	43 888	43 114
C4	84 389	76 235	73 158	61 649	47 091	46 098
C5	87 123	79 493	76 111	64 091	47 611	46 547
C6	78 846	72 414	69 187	57 983	44 981	43 866
D1	79 112	72 932	70 034	61 040	45 388	44 677
D2	84 351	76 673	73 400	61 189	45 148	44 121
D3	90 940	83 678	80 111	67 598	50 314	49 348
D4	89 107	82 013	78 457	65 348	48 669	47 553
D5	81 858	75 674	72 583	62 742	48 091	47 303
D6	77 074	70 187	67 065	56 979	43 871	43 124
E1	84 705	77 221	74 279	63 912	43 696	42 475
E2	86 539	79 169	77 991	75 935	64 090	63 976
E3	86 126	78 353	75 507	64 528	45 522	44 371
E4	83 605	73 878	72 047	67 011	49 278	48 822
E5	85 776	77 375	75 028	66 943	44 337	43 524
E6	87 735	79 246	76 250	66 011	46 493	45 485

注:表中第 1 列为样本的 ID;第 2 列为原始数据中能同时匹配到正向和反向引物的序列量;第 3 列为去除低质量序列后的数据量;第 4 列为去噪后的序列数据量,即有效序列量;第 5 列为拼接后的序列量;第 6 列为去除嵌合体后序列量,即高质量序列量;第 7 列为去除单例后的序列量。

2.2 Alpha 多样性分析

Alpha 多样性是指局部均匀生境下的物种在丰富度(richness)、多样性(diversity)和均匀度(evenness)等方面的指标,也被称为生境内多样性(within - habitat diversity)。

插页Ⅷ图 5 Chao1 和 Observed species 指数表征丰富度,Shannon 和 Simpson 指数表征多样性,Faith's PD 指数表征基于进化的多样性,Pielou's evenness 指数表征均匀度,Good's coverage 指数表征覆盖度。B 组的各指数最接近 E 组,各组均$P < 0.05$,差异有统计学意义。

插页Ⅷ图 6 稀疏曲线图中曲线的平缓程度,反映了测序深度对于观测样本多样性的影响大小,在本研究中,测序深度逐渐增加,对应的曲线逐渐趋于平缓,说明物种的测序数量足够,即使测序数量继续上升,也无法检测到大量的尚未发现的新 OTU 数目,即 OTU 数目不再向上延伸。

2.3 Beta 多样性分析

Beta 多样性是指沿着环境梯度变化的不同群落之间,物种组成的相异性或物种沿环境梯度的更替速率,因此也被称为生境间多样性(between - habitat diversity)。

各组大鼠肠内容物主坐标分析(Principal coordinates analysis,PCoA)(插页Ⅺ图 7)B 组与 E 组的差异最小为 36.6%,A 组、C 组、D 组与 E 组的差异分别为 46.9%、48.3%、46.8%,差异变化不大。插页Ⅻ图 8 为各组大鼠肠内容物的 NMDS 结果,其应力值 Stress = 0.152 < 0.2 结果较可靠。插页Ⅻ图 9 层次聚类分析图中 D 组与 E 组的距离最远,相似度最差,而 A、B、C 组与 E 组的距离小于 D 组,相似性较 D 组高。

2.4 物种差异与标志物种分析

从各组大鼠肠内容物组成热图的组内均值可以见门水平、种水平、属水平 E 组与 B 组最为相近,在目水平和种水平 E 组与 C 组最为相近(插页ⅩⅢ图 10、插页ⅩⅣ图 11)。LEfSe 分枝图(插页ⅩⅢ图 12)可见,放线菌门(p__Actinobacteria)在组间存在显著差异,且在 B 组(红色)中被显著富集,丰度最高,即 B 组中的放线菌门的丰度显著高于其他各组。

3 讨论

现代研究认为 UC 患者的肠道菌群较正常人群发生了显著的变化,其菌群丰度与多样性降低[12-13]。白头翁汤可降低 UC 小鼠的肠道通透性,增加紧密连接蛋白(Occludin and zonula occludens - 1)的表达,并降低结肠中磷酸核因子(p - NF) - κB 和磷酸细胞外信号调节激酶(p - ERK)的表达,进而修复肠道上皮屏障,抑制炎症反应[14]。白头翁皂苷中所含的多种糖基,代谢产生大量的葡萄糖、鼠李糖、阿拉伯糖等多糖,经过肠道微生物代谢产生短链脂肪酸 SCFAs,可能是白头翁皂苷影响肠道菌群的主要原因[15]。白头翁皂苷对肠道菌群的调节是其抗 UC 活性的重要途径,可增加有益菌 norank F Muribaculaceae 和 norank F norank O Clostridia UCG - 014,减少有害拟杆菌[16]。肝肺并治方是由白头翁汤变化而来,是否可以改变肠道菌群来治疗 UC 目前尚不明确。因此,本研究通过肝肺并治方对 UC 大鼠的干预,采用 16S rDNA 测序技术,从肠道微生态角度探讨肝肺并治方对大鼠肠道菌群的调节作用。

3.1 肝肺并治方对 UC 大鼠肠道菌群物种组成分析

各组大鼠肠内容物门水平优势菌种为厚壁菌(Firmicutes)和拟杆菌(Bacteroidetes),造模后厚壁菌数量降低,而拟杆菌数量增加,肝肺并治方干预可增加厚壁菌数量,降低杆菌数量,其中肝肺并治方中剂量组效果最为明显。研究表明在健康人群中,厚壁菌门和拟杆菌门是主要的菌群,二者存在互相促进的共生关系,厚壁菌/拟杆菌(F/B)比率的增高被认为是肠道微生态失调的标志[17-19]。纲水平的优势菌种为梭菌纲(Clostridia)与拟杆菌纲(Bacteroidia),分属于厚壁菌门和拟杆菌门,是肠道微生物稳态下微生物群的主要专性厌氧菌[20]。目水平优势菌种为梭菌目(Clostridiales)与拟杆菌目(Bacteroidales),与门、纲水平结果基本一致。不同于门水平,UC 大鼠模型组优势菌种均增加,而肝肺并治方干预后可降低其数量,以肝肺并治方中剂量组最为明显。说明 UC 大鼠的肠道菌群在不同水平引起失衡,而适当剂量的肝肺并治方的干预可纠正这种平衡。

3.2 肝肺并治方对 UC 大鼠肠道菌群多样性的影响

本实验肠道菌群高通量测序研究了肝肺并治方对 UC 大鼠肠道菌群 α 多样性和 β 多样性的影响。分析结果估计其丰富度、多样性、均匀度等方面指标,α 多样性判断种群中微生物种类的一致性,β 多样性判断样本之间微生物物种的差异性[21]。

α 多样性稀疏曲线图中,随着测序深度增加,曲线趋于平缓,说明本研究物种的测序数量足够,即使测序数量继续上升,也无法检测到大量的尚未发现的新 OTU 数目,说明本研究选取的样本量足够。研究认为 UC 患者的肠道微生物群 α 多样性显著低于健康对照受试者,UC 患者活动期的 α 多样性低于

缓解期[22-23]，说明随着 UC 患者的病情加重，α 多样性降低，纠正 α 多样性可缓解 UC 患者的病情，根据本研究的 α 多样性箱型图，肝肺并治方中剂量组的各指数最接近空白组，说明中医中剂量组可纠正 UC 大鼠的 α 多样性，使其趋于正常大鼠菌群。

β 多样性的距离矩阵与 PCoA 分析图中可见肝肺并治方中剂量组与空白组的差异最小，肝肺并治方高剂量组、肝肺并治方低剂量组、模型组与空白组的差异变化不大。各组肠道菌群的次聚类分析图中模型组与空白组的距离最远，相似度最差，而肝肺并治方高中低剂量组与空白组的距离小于模型组，相似性较模型组高。说明通过对 β 多样性的分析，UC 模型大鼠肠道菌群与空白组正常大鼠的肠道菌群差异最大，而通过中药肝肺并治方的干预可缩小其差异，其中肝肺并治方中剂量组的效果最佳。

3.3 肝肺并治方对 UC 大鼠肠道菌群物种差异与标志物种分析

分析各组大鼠肠内容物组成热图的组内均值，门水平、种水平、属水平肝肺并治方中剂量组与空白组最为相近，在目水平和种水平肝肺并治方高剂量组与空白组最为相近，说明不同水平肝肺并治方中剂量组与肝肺并治方高剂量组最接近正常大鼠菌群结构。分析 LEfSe 分枝图，放线菌门（p__Actinobacteria）在组间存在显著差异，且在肝肺并治方中剂量组中被显著富集，丰度最高. 放线菌门与厚壁菌门、拟杆菌门同是人类肠道微生物群中最丰富的门[24]，厚壁菌和拟杆菌门在成人中占主导地位，放线菌在母乳喂养的婴儿中占主导，其中最主要的是双歧杆菌属，在母乳喂养的婴儿中双歧杆菌的含量可超过总细菌群的 90%。它们是新生儿肠道的首批微生物定植体之一，也是人体最重要的益生菌，在生理发育中，甚至肠脑轴中都发挥着关键作用[25-26]。本实验肝肺并治方中剂量组中的放线菌门的丰度显著高于其他各组，说明肝肺并治方可调节肠道益生菌的分布。

4 结论

本实验对 UC 大鼠肠内容物样本的肠道菌群进行了 16S rRNA 测序及分析，首先证实本研究物种的测序数量足够，选取的样本量足够。其次正常大鼠门水平优势菌种为厚壁菌和拟杆菌，造模后厚壁菌数量降低，而拟杆菌数量增加，肝肺并治方干预可增加厚壁菌数量，降低杆菌数量，其中肝肺并治方中剂量组效果最为明显。而肝肺并治方中剂量组的各指数最接近空白组，说明了肝肺并治方肝肺并治方中剂量组可纠正 UC 大鼠的肠道菌群分布，使其趋于正常大鼠菌群。

参考文献

[1] UNGARO R, MEHANDRU S, ALLEN P B, et al. Ulcerative colitis [J]. Lancet, 2017, 389(10080): 1756-1770.
[2] CARUSO R, LO B C, NÚÑEZ G. Host-microbiota interactions in inflammatory bowel disease[J]. Nat Rev Immunol, 2020, 20(7): 411-426.
[3] SEGAL J P, LEBLANC J F, HART A L. Ulcerative colitis: an update[J]. Clin Med (Lond), 2021, 21(2): 135-139.
[4] GUO X Y, LIU X J, HAO J Y. Gut microbiota in ulcerative colitis: insights on pathogenesis and treatment[J]. J Dig Dis, 2020, 21(3): 147-159.
[5] ZHANG Y L, CAI L T, QI J Y, et al. Gut microbiota contributes to the distinction between two traditional Chinese medicine syndromes of ulcerative colitis [J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(25): 3242-3255.
[6] ARUMUGAM M, RAES J, PELLETIER E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome[J]. Nature, 2011, 473(7346): 174-180.
[7] 余今菁，李欢，胡邱宇，等. 基于高通量测序技术的溃疡性结肠炎患者肠道菌群多样性研究[J]. 华中科技大学学报(医学版)，2018, 47(4): 460-465.
[8] 中国中西医结合学会. 溃疡性结肠炎中西医结合诊疗专家共识[J]. 中国中西医结合杂志, 2023, 43(1): 5-11.
[9] 唐容川，著. 血证论[M]. 彭荣琛，齐玲玲，点评. 北京：中国医药科技出版社, 2020: 84.
[10] 柳越冬，陶弘武. 加味通腑汤对溃疡性结肠炎大鼠 IL-1β 和 IL-10 影响的研究[J]. 辽宁中医杂志，2016，43(8)：1761-1764.
[11] SÁNCHEZ-FIDALGO S, CÁRDENO A, SÁNCHEZ-HIDALGO M, et al. Dietary extra virgin olive oil polyphenols supplementation modulates DSS-induced chronic colitis in mice[J]. J Nutr Biochem, 2013, 24(7): 1401-1413.
[12] SAURABH K, TARINI S G, SARANSH J, et al. Gut microbiome diversity in acute severe colitis is distinct from mild to moderate ulcerative colitis[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2021, 36(3): 731-739.
[13] HU Y J, CHEN Z Z, XU C C, et al. Disturbances of the gut microbiota and microbiota-derived metabolites in inflammatory bowel disease[J]. Nutrients, 2022, 14(23): 5140.
[14] MIAO Z W, CHEN L P, FENG H, et al. Baitouweng decoction ameliorates ulcerative colitis in mice partially attributed to regulating Th17/treg balance and restoring intestinal epithelial barrier[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 531117.
[15] LI Z X, SONG Y G, XU W Z, et al. *Pulsatilla chinensis* saponins improve SCFAs regulating GPR43-NLRP3 signaling pathway in the treatment of ulcerative colitis [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 308: 116215.
[16] LIU Y L, ZHOU M Y, YANG M, et al. *Pulsatilla chinensis* saponins ameliorate inflammation and DSS-induced ulcerative colitis in rats by regulating the composition and diversity of intestinal flora [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 728929.
[17] WALKER A W, SANDERSON J D, CHURCHER C, et al. High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease[J]. BMC Microbiol, 2011, 11: 7.
[18] LI L, ZHONG S J, HU S Y, et al. Changes of gut microbiome composition and metabolites associated with hypertensive heart failure rats[J]. BMC Microbiol, 2021, 21(1): 141.
[19] 陈说，张帆，范艳飞，等. 膳食胆酸对营养性肥胖大鼠肠道炎症的改善及对肠道菌群中拟杆菌门与厚壁菌门比例的影响[J]. 胃肠病学和肝病学杂志，2022，31(10)：1126-1131.
[20] LEE J Y, CEVALLOS S A, BYNDLOSS M X, et al. High-fat diet and antibiotics cooperatively impair mitochondrial bioenergetics to trigger dysbiosis that exacerbates pre-inflammatory bowel disease [J]. Cell Host Microbe, 2020, 28(2): 273-284.
[21] ZHU R, TANG J R, XING C F, et al. The distinguishing bacterial features from active and remission stages of ulcerative colitis revealed by paired fecal metagenomes [J]. Front Microbiol, 2022, 13: 883495.
[22] ZHU S Y, HAN M Z, LIU S M, et al. Composition and diverse differences of intestinal microbiota in ulcerative colitis patients[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 953962.
[23] MA H Q, YU T T, ZHAO X J, et al. Fecal microbial dysbiosis in Chinese patients with inflammatory bowel disease[J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(13): 1464-1477.
[24] CAI J, SUN L L, FRANK J G, et al. Gut microbiota-derived bile acids in intestinal immunity, inflammation, and tumorigenesis[J]. Cell Host Microbe, 2022, 30(3): 289-300.
[25] HIDALGO-CANTABRANA C, DELGADO S, RUIZ L, et al. Bifidobacteria and their health-promoting effects[M]. 2018.
[26] KIM N, YUN M S, OH Y J, et al. Mind-altering with the gut: modulation of the gut-brain axis with probiotics[J]. J Microbiol, 2018, 56(3): 172-182.

肝肺并治方干预溃疡性结肠炎大鼠肠道菌群的研究

（正文见 28－31 页）

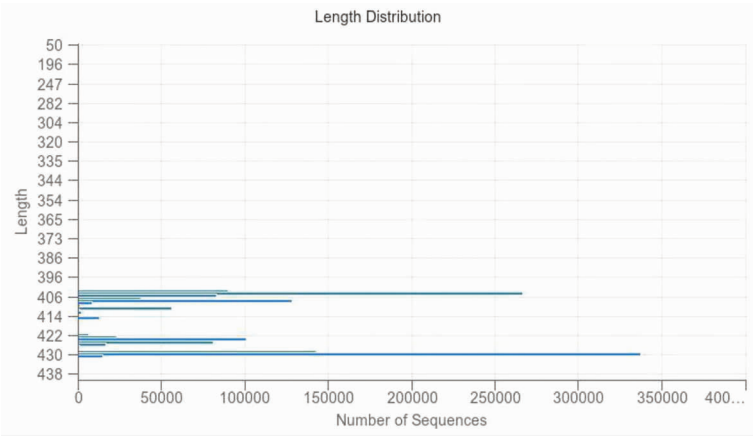


图 1　序列长度分布图

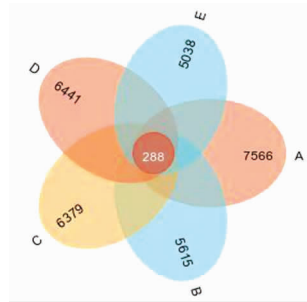
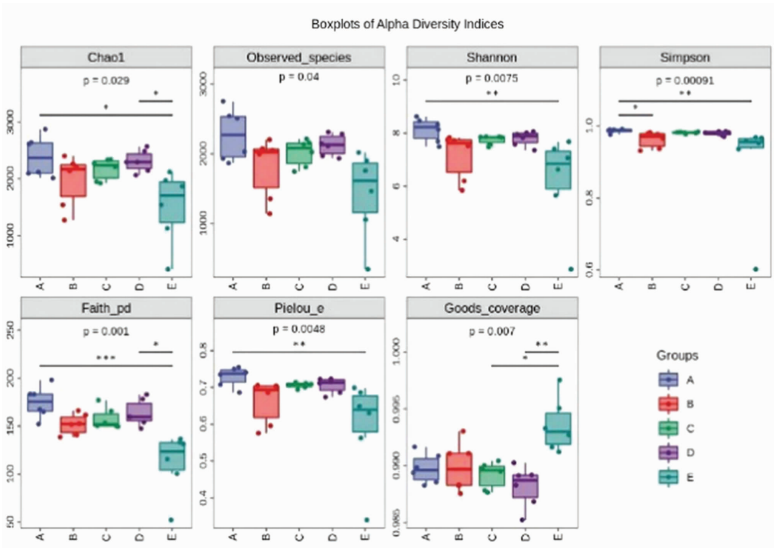
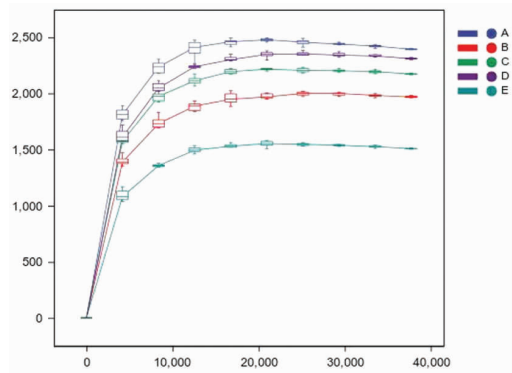


图 2　ASV/OTU 韦恩图



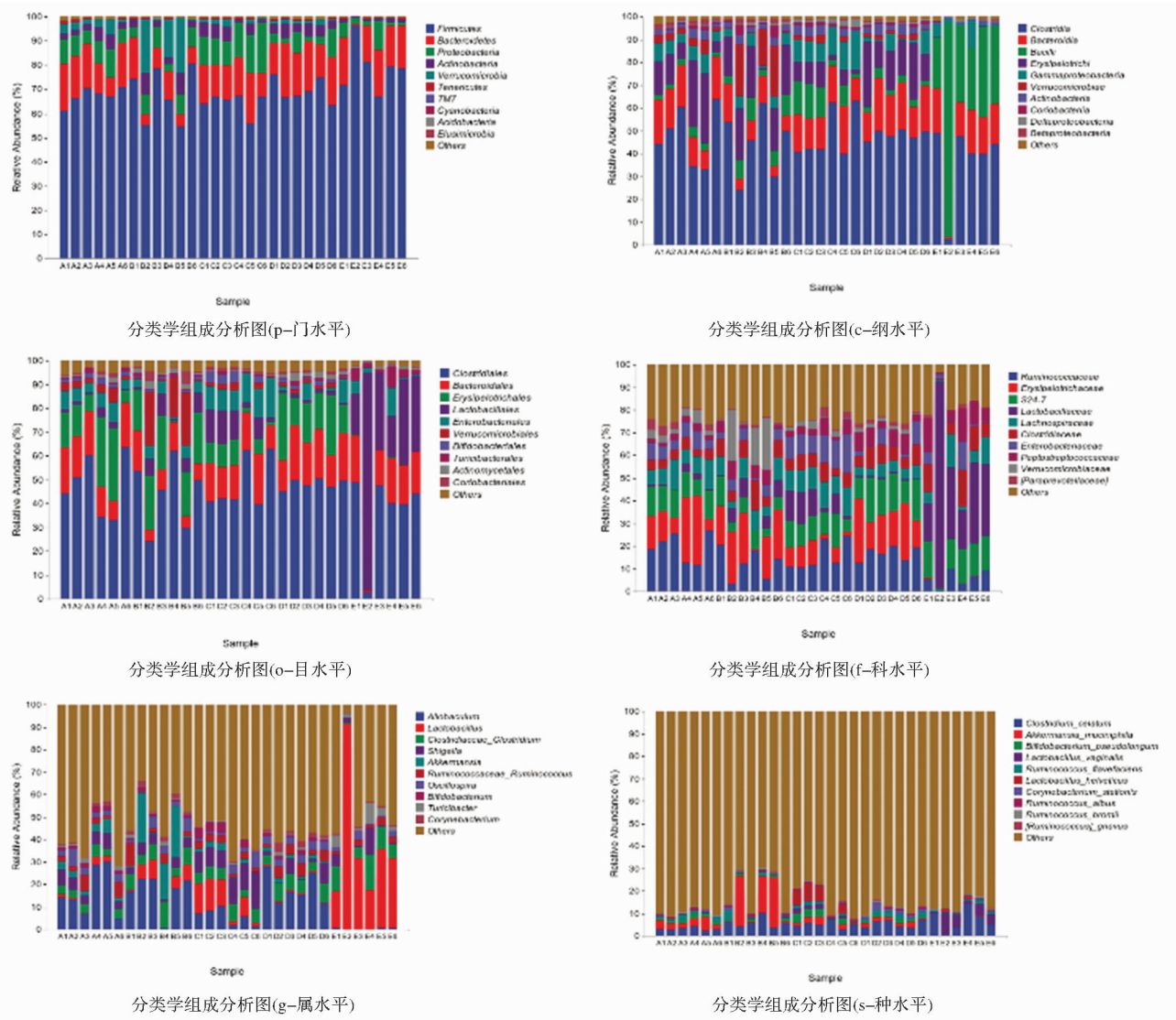
注：每个 panel 对应一种 alpha 多样性指数，在其顶端灰色区域标识。每个 panel 中，横坐标为端线，上下四分位数（Interquartile range，IQR）；中位线，中位数；上下边缘，最大值和最小值（1.5 倍的 IQR 范围之内的极值）；在上下边缘的外部的点，表示异常值。多样性指数标签下的数字为 Kruskal－Wallis 检验的 P 值。图中 * 表示 $P<0.05$；** 表示 $P<0.01$；*** 表示 $P<0.001$。

图 5　Alpha 多样性指数



注：横坐标为抽平深度，纵坐标为 10 次计算的 alpha 多样性指数的中位值与箱线图。箱线图中，各符号含义如下：箱的上下端线，上下四分位数（Interquartile range，IQR）；中位线，中位数；上下边缘，最大值和最小值（1.5 倍的 IQR 范围之内的极值）。

图 6　稀疏曲线图



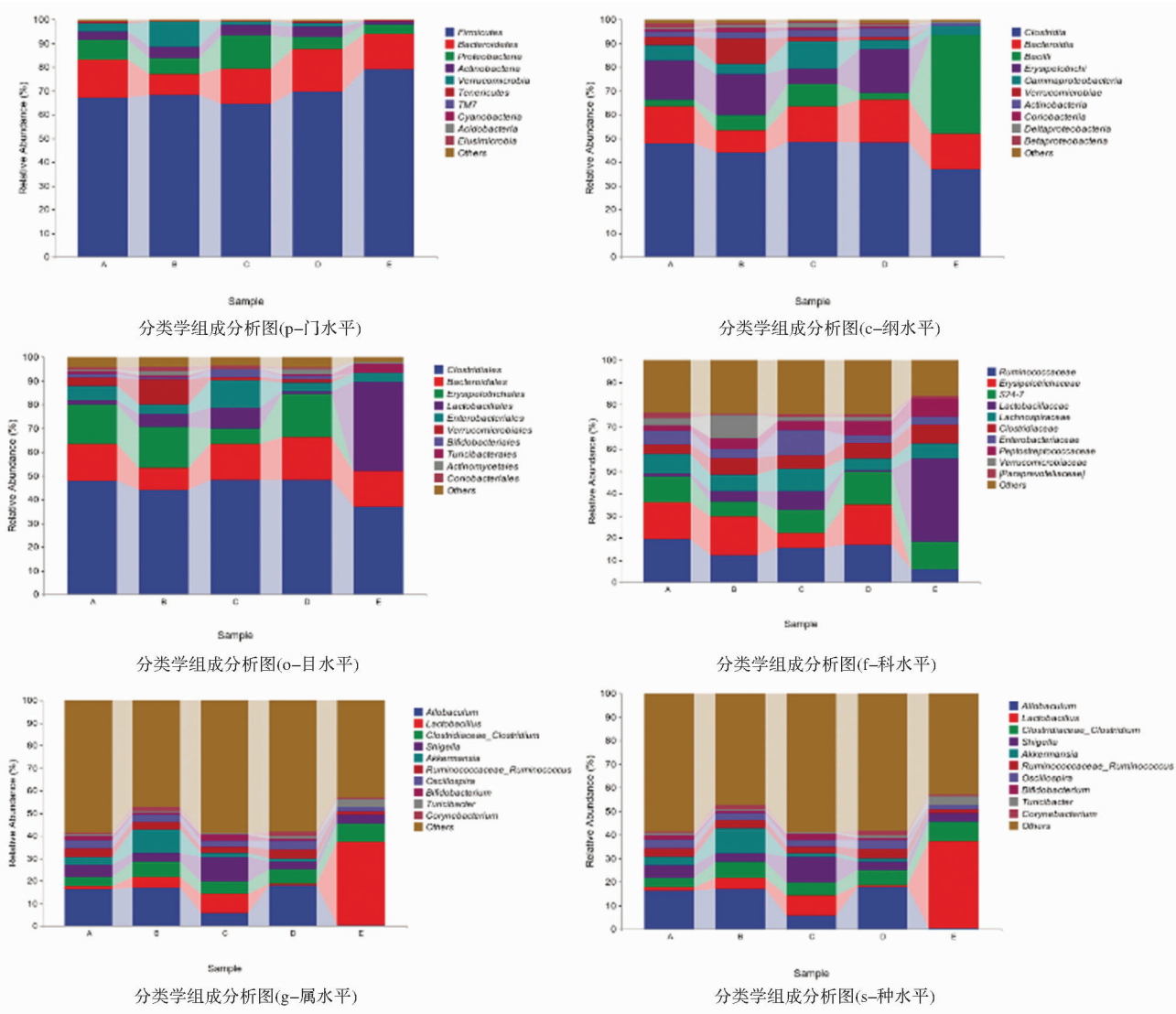
分类学组成分析图(p–门水平)　　分类学组成分析图(c–纲水平)

分类学组成分析图(o–目水平)　　分类学组成分析图(f–科水平)

分类学组成分析图(g–属水平)　　分类学组成分析图(s–种水平)

注:横坐标为各样本,纵坐标为特定分类水平下各分类单元的相对丰度。

图 3　分类学组成分析图



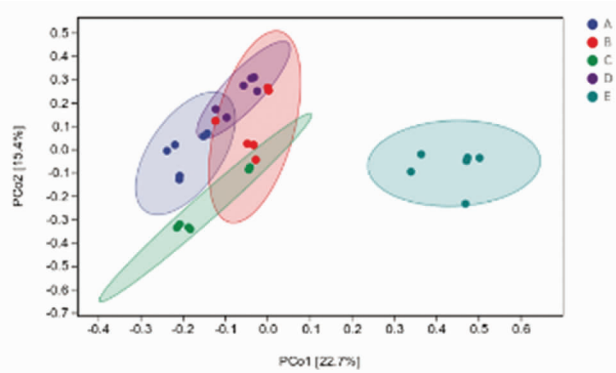
分类学组成分析图(p–门水平)　分类学组成分析图(c–纲水平)

分类学组成分析图(o–目水平)　分类学组成分析图(f–科水平)

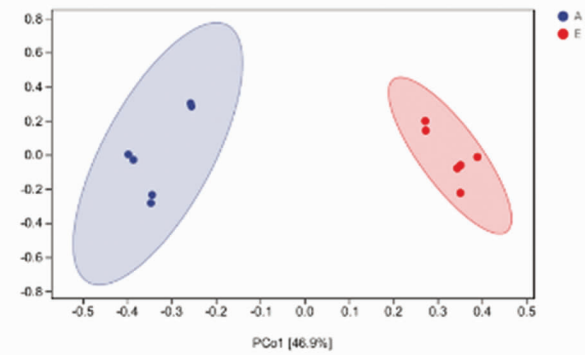
分类学组成分析图(g–属水平)　分类学组成分析图(s–种水平)

注:横坐标为各样本,纵坐标为特定分类水平下各分类单元的相对丰度。

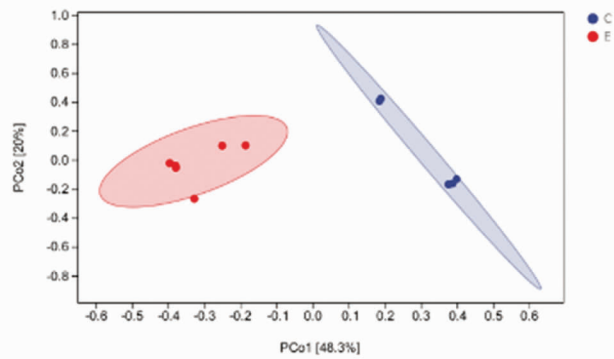
图 4　分类学组成分析图(组内均值)



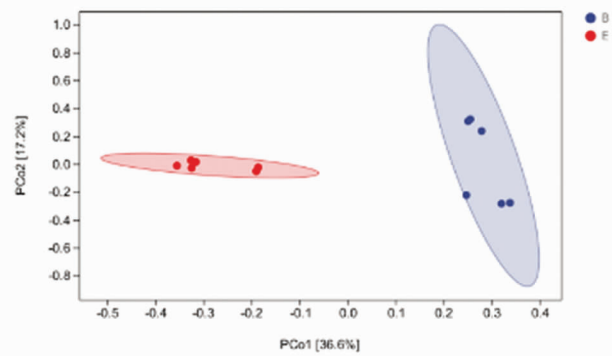
肝肺并治方高剂量组



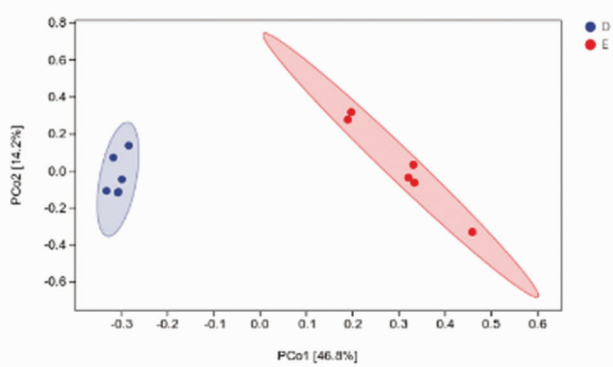
肝肺并治方中剂量组



肝肺并治方低剂量组



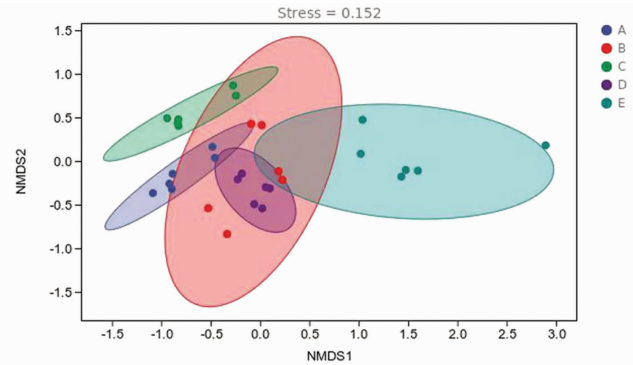
模型组



空白组

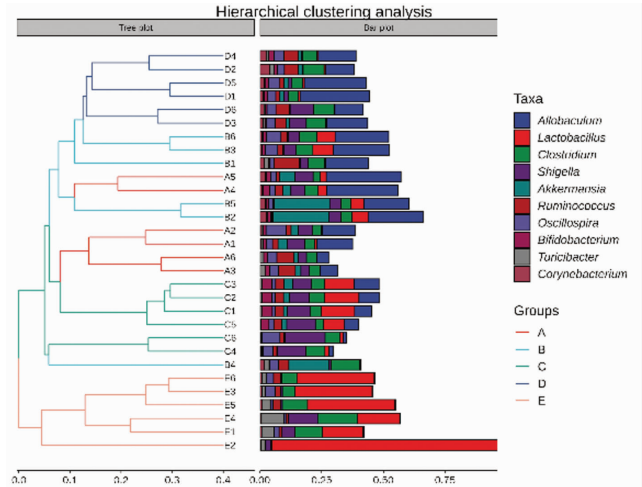
注：每个点代表一个样本，不同颜色的点指示不同的分组。坐标轴括号中的百分比代表了对应的坐标轴所能解释的样本差异数据（距离矩阵）的比例。建议作投影分析（不能直接看距离），即两点在坐标轴上的投影距离越近，表明这两个样本在相应维度中的群落组成越相似。当各分组的样本数不少于 4 个时，我们还提供了椭圆形虚线圈，默认为 95% 的置信椭圆（即该样本组若存在 100 个样本则会有 95 个落在该椭圆内）。

图 7　距离矩阵与 PCoA 分析



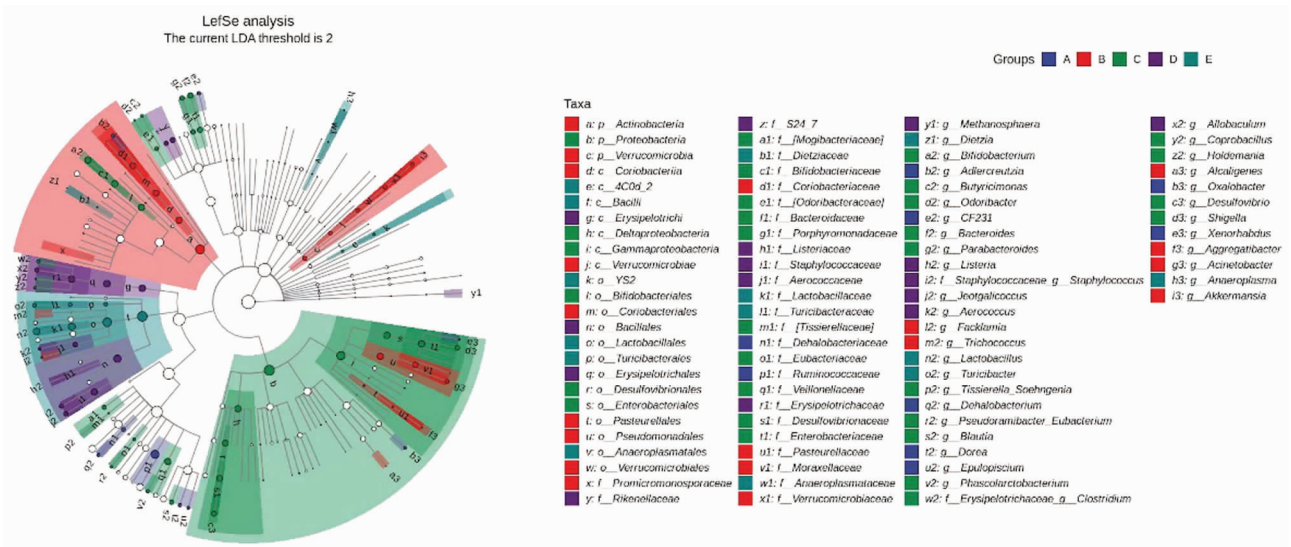
注：每个点代表一个样本，不同颜色的点指示不同的样本（组）。由于 NMDS 采用等级排序，因此可近似认为两点之间的距离越近（远），表明两个样本中微生物群落的差异越小（大）。当各分组的样本数不少于 4 个时，我们提供了椭圆形虚线圈，其为 95% 置信椭圆（即该样本组 100 个样本中会有 95 个落在其中）。

图 8　NMDS 分析



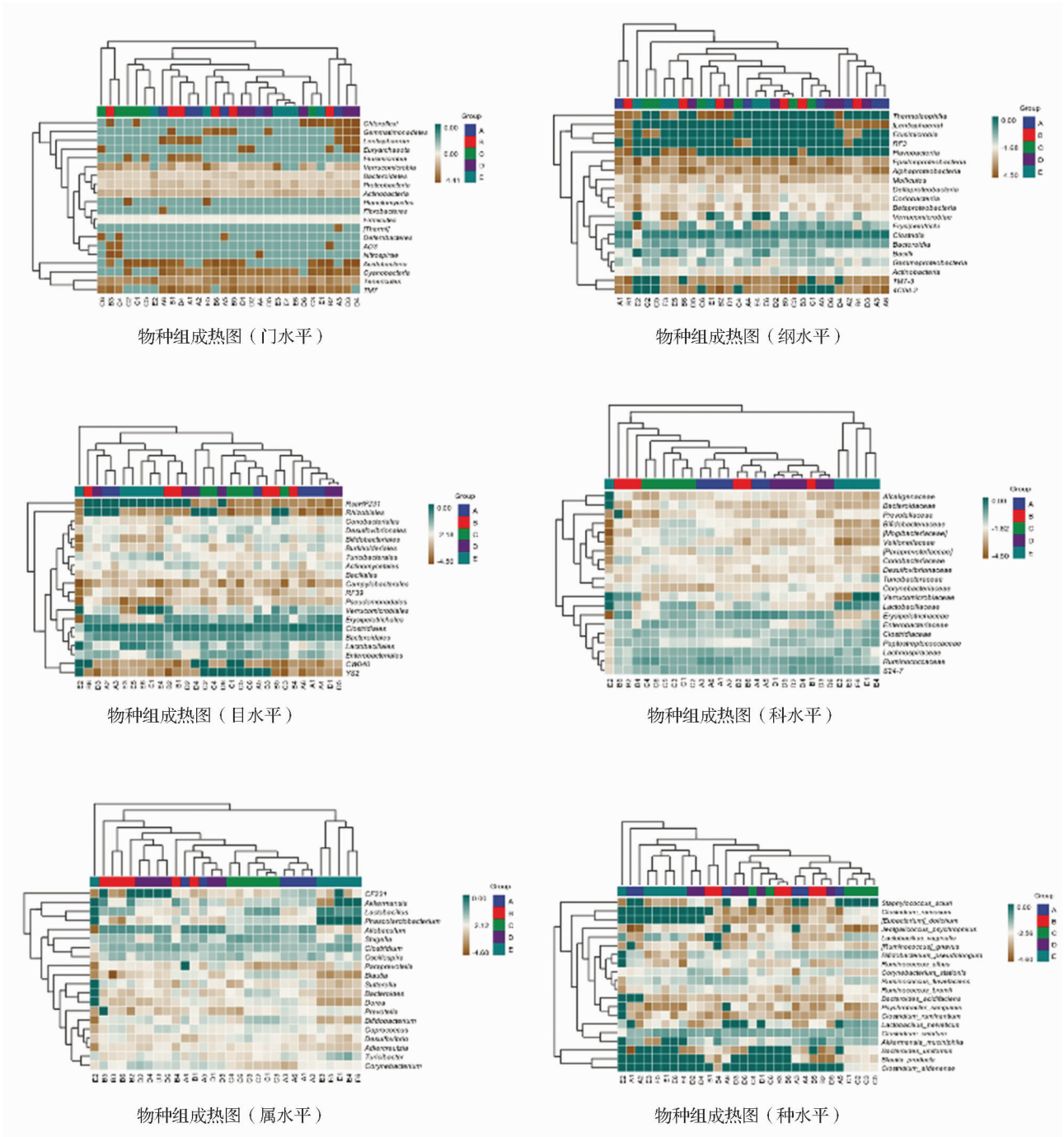
注：左边的 panel 为层次聚类树图，其中样本根据彼此之间的相似度聚类，样本间的分支长度越短，两样本越相似；右图的 panel（默认绘制）为丰度排名前 10 的属的堆叠柱状图。

图 9　层次聚类分析



注：分类学分枝图展示了样本群落中从门到属（从内圈到外圈）主要分类单元的分类等级关系。节点大小对应于该分类单元的平均相对丰度；空心节点代表组间差异不显著的分类单元，而其他颜色（如绿色和红色）的节点则表明这些分类单元体现出显著的组间差异，且在该色所代表分组样本中丰度较高。字母则标识了组间存在显著差异的分类单元的名称（k－界 p－门 c－纲 o－目 f－科 g－属）。

图 12　LEfSe 分析



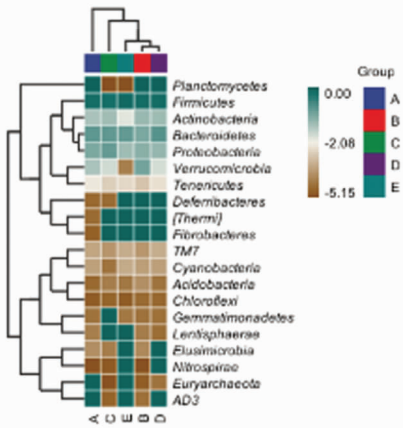
物种组成热图（门水平）　物种组成热图（纲水平）

物种组成热图（目水平）　物种组成热图（科水平）

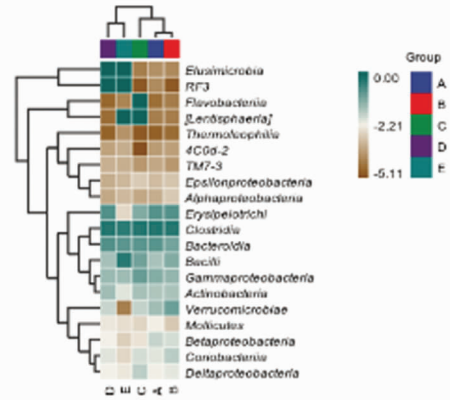
物种组成热图（属水平）　物种组成热图（种水平）

注：样本按照物种组成数据的欧式距离（euclidean distance）进行 UPGMA 聚类（默认聚类算法），并默认根据聚类结果排列；否则则按照样本/分组的默认顺序排列。默认对物种进行聚类，即按照其组成数据的 Pearson 相关性系数矩阵进行 UPGMA 聚类（默认聚类算法），并根据聚类结果排列；否则则按照物种在样本/分组中的平均丰度排序。

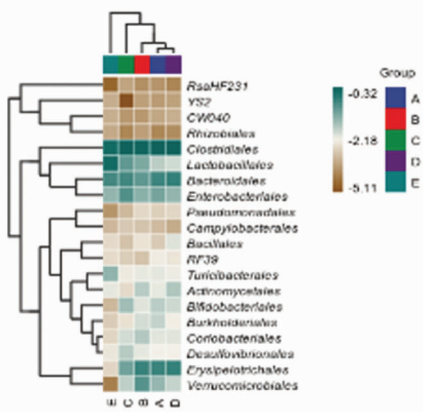
图 10　物种组成热图



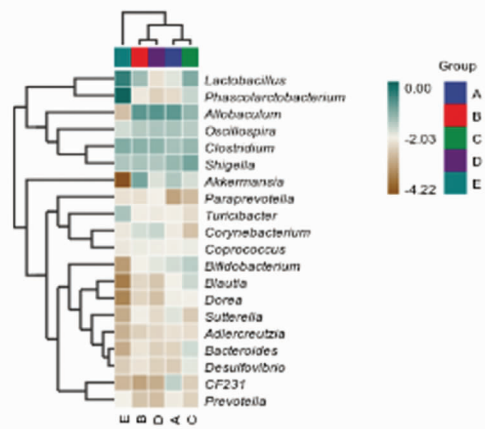
物种组成热图组内均值（门水平）



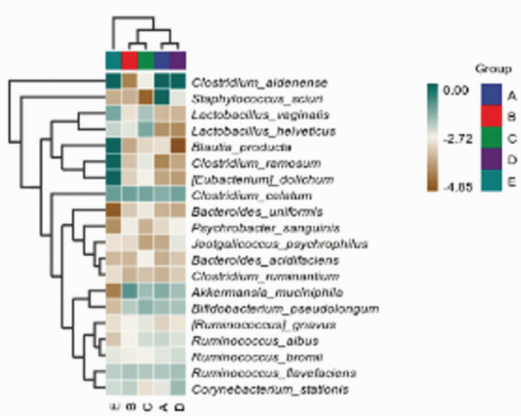
物种组成热图组内均值（纲水平）



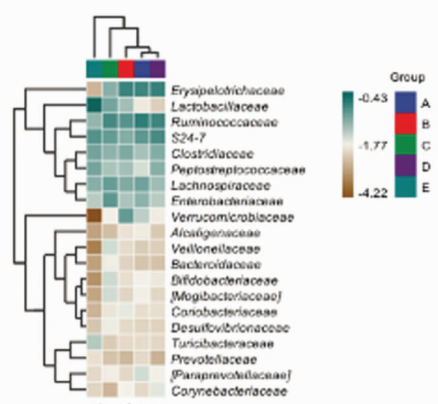
物种组成热图组内均值（目水平）



物种组成热图组内均值（属水平）



物种组成热图组内均值（种水平）



物种组成热图组内均值（科水平）

注：样本按照物种组成数据的欧式距离（euclidean distance）进行 UPGMA 聚类（默认聚类算法），并默认根据聚类结果排列；否则则按照样本/分组的默认顺序排列。默认对物种进行聚类，即按照其组成数据的 Pearson 相关性系数矩阵进行 UPGMA 聚类（默认聚类算法），并根据聚类结果排列；否则则按照物种在样本/分组中的平均丰度排序。

图 11 物种组成热图组内均值