

DOI: 10.5846/stxb201309182306

王春晖, 张华玲, 张祺玲, 尹抗抗, 胡汝晓, 谭周进. 超微七味白术散对肠道厌氧微生物代谢多样性的调控作用. 生态学报, 2015, 35(14): 4843-4851.

Wang C H, Zhang H L, Zhang Q L, Yin K K, Hu R X, Tan Z J. Effects of ultra-micro powder qiweibaizhusan on metabolism diversity of intestinal anaero-microbiota in diarrheal mice with dysbacteriosis. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(14): 4843-4851.

超微七味白术散对肠道厌氧微生物代谢多样性的调控作用

王春晖^{1,4}, 张华玲², 张祺玲³, 尹抗抗⁴, 胡汝晓¹, 谭周进^{4,*}

1 湖南省食用菌研究所, 长沙 410013

2 湖南省珍贵濒危药材工程研究中心, 长沙 410007

3 湖南省核农学与航天育种研究所, 长沙 410125

4 湖南中医药大学, 长沙 410208

摘要: 探讨超微七味白术散对菌群失调腹泻的肠道微生态调节作用。采用同时灌胃头孢拉定和硫酸庆大霉素进行小鼠菌群失调造模, 灌胃给药七味白术散传统汤药和超微七味白术散 1/2 剂量的汤药进行治疗, 正常组和模型组灌胃等量的无菌水, 治疗 3 d 后, 提取肠道微生物, 在厌氧条件下, 运用 Biolog 微生物自动分析系统研究肠道微生物的代谢情况。培养 72 h 时, 各组的颜色平均变化率 (AWCD) 趋于稳定, 且 1/2 剂量的超微汤药治疗组 > 正常组 > 传统汤药治疗组 > 模型组; 正常组的 Shannon 指数和 Simpson 指数为最大, 且与其他各组差异极显著 ($P < 0.01$), 1/2 剂量超微汤药治疗组的 Shannon 均匀度和 McIntosh 指数最大, Shannon 均匀度与正常组差异不显著 ($P > 0.05$), 其余指标与各组都存在显著性差异 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。聚类分析和主成分分析表明抗生素的抑菌作用明显, 使小鼠肠道微生物的代谢受到影响, 七味白术散传统汤药和 1/2 剂量超微汤药的调控使小鼠肠道微生物的代谢多样性逐渐恢复平衡, 但两种汤药的调控作用不尽相同。七味白术散超微饮片 1/2 剂量对肠道厌氧微生物代谢多样性的调控作用优于传统饮片。

关键词: 超微中药; 七味白术散; Biolog-Eco; 代谢多样性; 肠道厌氧微生物

Effects of ultra-micro powder qiweibaizhusan on metabolism diversity of intestinal anaero-microbiota in diarrheal mice with dysbacteriosis

WANG Chunhui^{1,4}, ZHANG Hualing², ZHANG Qiling³, YIN Kangkang⁴, HU Ruxiao¹, TAN Zhoujin^{4,*}

1 Hunan Domestic Fungus Research Institute, Changsha 410013, China

2 Hunan Engineering Research Center of Precious and Endangered Medicinal Materials, Changsha 410007, China

3 Hunan Institute of Nuclear Agricultural Sciences and Space-induced Breeding, Changsha 410125, China

4 Hunan University of TCM, Changsha 410208, China

Abstract: Compound traditional Chinese medicine is one of the medication characteristics of traditional Chinese medicine, as well as its essence. Intestinal microbiota have a crucial effect on hosts' metabolic function and life activities. Intestinal microbiota are devoted to dissolution and transformation of the Chinese herbal medicinal ingredients by hydrolysis and restoring reaction. In order to investigate the microecological mechanisms for ultra-micro Qiweibaizhusan on diarrheal mice with intestinal dysbacteriosis, the mouse model with dysbacteriosis was constructed by intragastric administration with antibiotics mixture composed of cefradine capsules and gentamycin sulfate injection. One group of diarrheal mice were

基金项目: 国家自然科学基金 (81173214)

收稿日期: 2013-09-18; 修订日期: 2014-04-16

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: tanzhjin@sohu.com

treated with the traditional decoction of Qiweibaizhusan, the other group of diarrheal mice were given 1/2 dose of ultra-micro powder Qiweibaishusan, and the normal group and the diarrheal group mice were treated with sterilized water by intragastric administration. After three days' treatment, the intestinal microbiota were extracted, and their carbon metabolisms were determined by Biolog Microbial Identification System. The results showed that all groups of average of wall color development (AWCD) tended to be stable throughout 72 h cultivation period, but AWCD of the 1/2 dose of ultra-micro powder group > the normal group > the traditional decoction group > the model group. The microbial diversity index, including Shannon index and Simpson index, in the normal group were the largest, and there were significant differences compared with that in other groups ($P < 0.01$). The Shannon evenness and McIntosh index of the 1/2 dose of ultra-micro powder treated group were very significantly different compared to that of other group ($P < 0.01$, $P < 0.05$), except that the Shannon evenness wasn't significantly different compared with that of the normal group ($P > 0.05$). The results of clustering analysis and principal components analysis suggest that bacteriostasis function of antibiotics was prominent, and some metabolic pathways of intestinal microbiota in mice were influenced. The metabolic diversity of intestinal microbiota in mice was gradually regained by the regulatory functions of 1/2 dose of ultra-micro powder and traditional decoction of Qiweibaishusan. There were differences in the regulatory roles of the traditional decoction and ultra-micro powder decoction. The regulatory role of 1/2 dose of ultra-micro powder was more notable than that of traditional decoction. The ultra-micro Qiweibaizhusan had a prominent regulatory role on metabolic diversity of intestinal anaerobic microbiota in mice, and had a good treatment effect on diarrhea with intestinal dysbacteriosis.

Key Words: ultra-micro powder traditional Chinese medicine; qiweibaizhusan; Biolog-Eco; metabolic diversity; intestinal anaerobic microbiota

目前已知健康人肠道内栖息着约 10^{14} 多个微生物,是人体细胞总数的 10—20 倍,约 1000 种^[1]。其中 90%—99.9% 是厌氧菌,在这些细菌中主要包括类杆菌属、真杆菌属、双歧杆菌属、乳酸杆菌属等至少 14 个菌属。双歧杆菌是人和动物胃肠道微生物区系中的一种非常重要的正常厌氧菌,在机体肠道内发挥很重要的生理作用,对维持肠道菌群平衡、治疗肠道功能紊乱、控制内毒素产生及促进某些营养物质的吸收具有重要影响^[2-3]。乳酸杆菌既可以补充肠道的正常菌群,又能促进有益菌的增殖,且对病原菌有明显的生物拮抗作用,对肠道健康有着不可低估的积极影响^[4]。酪酸梭菌 (*Clostridium butyricum*) 抑制艰难梭菌 (*Clostridium difficile*) 等病原菌的生长繁殖,促进双歧杆菌、乳酸菌等肠道有益菌的生长繁殖,加强肠道黏膜营养代谢,保护受损的黏膜屏障,用作微生态制剂具有很好的疗效^[5]。大量的研究表明,肠道内的厌氧菌对人体的生长发育、免疫功能、营养、发病机制、健康等起着重要的作用。

中药成分通过人体肠道菌群的水解和还原反应被转化,降低或消除其毒副作用,对提高药效,改变药用功能意义重大^[6]。有些中药可能必须通过人体肠道菌群的代谢后才能发挥作用^[7]。代谢产物的质变和量变是生物体受基因型与环境的双重影响,它们的种类和数量变化被视为生物系统对基因或环境变化的最终响应^[8-9]。深入研究口服中药对人体肠道微生物代谢多样性的影响,有助于阐明中药的疗效机理,并为利用肠道微生物深入研究和应用中药奠定基础。

Biolog 微生物自动分析系统主要根据微生物对糖、醇、酸、酯、胺和大分子聚合物等 95 种碳源的利用情况进行分析,通过测定微生物对目标代谢途径中不同单一碳源利用能力的强弱,可直接反映对应关键酶活力大小,从而比较直观地表现微生物特定代谢途径整体代谢能力^[10-12]。有效利用 Biolog 系统对特定代谢能力进行分析,可了解肠道微生物代谢能力及其代谢调控作用,利用 Biolog 法来研究超微七味白术散对肠道厌氧微生物代谢多样性的影响,以探讨其对肠道厌氧微生物的调控功能,阐明其疗效机理。

1 材料

1.1 动物

清洁级昆明小鼠 24 只,雌雄各半,体质量(20 ± 2) g,由上海斯莱克斯实验动物有限公司/中国科学院上海实验动物中心提供。

1.2 药物

七味白术散:人参(山西)6 g、木香(云南)6 g、白茯苓(云南)10 g、炒白术(浙江)10 g、藿香叶(广东)10 g、葛根(湖南)10 g、甘草(内蒙古)3 g。均购自湖南中医药大学第一附属医院。

按上述配比,称取适量的药物,加冷水浸泡半小时后煎煮,先用大火煮沸,再改用小火煎煮,煎煮 2 次,每次煎煮时间不宜过长,一般 15—20 min。将两次煎煮的药液混合后即制成七味白术散传统汤剂,4 ℃冰箱中保存备用。

超微药:将单味中药超微粉碎,按上述配比称取适量超微粉末,加入适量开水冲泡,搅拌,冷却后低速离心取上清液,制成超微饮片 1/2 量汤剂,4 ℃冰箱中保存备用。

1.3 仪器与试剂

1.3.1 仪器

Biolog 微生物自动分析仪(型号 E1×808BLG);厌氧工作站(型号 BAETRON-1);超净工作台(型号 SW-CJ-1B);实验在广东省生态环境与土壤研究所广东省环境科学与技术公共实验室完成。

1.3.2 试剂

头孢拉定胶囊(石药集团欧意药业有限公司生产;批号 101005)硫酸庆大霉素注射液(山东鲁抗辰欣药业有限公司;批号 100928353),用无菌生理盐水配成浓度为 62.5 g/L 的抗生素混合液,4 ℃冰箱中保存备用。

1.4 饲料

由湖南中医药大学动物实验中心提供。

2 方法

2.1 动物分组

24 只小鼠适应性饲养 2 d 后,按照随机数字表将其分为正常组、模型组、传统七味白术散汤药治疗组、超微七味白术散汤药(1/2)剂量治疗组(根据课题组研究结果^[13-14],选用超微中药的该剂量与传统中药全量进行比较),共 4 个组,每组 6 只,雌雄各半,分笼饲养。

2.2 造模方法^[15]

正常组给予无菌水 0.4 mL 只⁻¹次⁻¹灌胃,其余各组采用抗生素混合液(头孢拉定和硫酸庆大霉素按照 4:3 的比例混合)0.4 mL 只⁻¹次⁻¹灌胃。每天 2 次,连续 5 d。

2.3 给药方法及剂量

造模成功后,灌胃给药,每天 2 次,连续 3 d。正常组及模型组给予无菌水,其余各组按小鼠临床等效用药剂量给药,即传统七味白术散传统汤药治疗组 0.16 g kg⁻¹ d⁻¹,七味白术散 1/2 量超微汤药治疗组 0.08 g kg⁻¹ d⁻¹。

2.4 小鼠肠道内容物的提取

将小鼠颈椎脱臼处死后立即放于超净工作台上,无菌采集各组空肠到回肠段内容物,样品混合收集于盛满冰的无菌袋中,并立即带回实验室,-20 ℃保存备用。

2.5 Biolog-Eco 分析

本研究采用 31 种碳源的生态板(Biolog-Eco)分析肠道微生物代谢多样性,碳源的编号同参考文献^[16]。在无菌条件下称取肠道内容物 5 g,放入已灭菌的盛有 45 mL 0.85% NaCl 溶液和玻璃珠的三角瓶中,摇床振

荡 30 min 后, 500 r/min 离心 3 min 去除食物残渣, 取上清液 5 mL 分装于 5 支已灭菌的 EP 管中, 10000 r/min 离心 20 min, 弃去上清液, 保留沉淀。每支 EP 管中加入 1 mL 0.85% 的 NaCl 无菌水, 涡旋振荡, 收集沉淀于灭菌过的盛有 45 mL 0.85% 的 NaCl 无菌水和玻璃珠的三角瓶中, 振荡 10 min, 制得肠道内容物中微生物的提取液, 最终稀释比例为 1:1000, 用于 Biolog 分析。用 8 通道加样器将稀释 1000 倍的菌液加入 Biolog-Eco 培养板上, 每孔 150 μ L。将接种好的培养板放入 37 $^{\circ}$ C 厌氧培养箱中培养, 于培养的第 4、12、24、48、60、72、96、120 天用 Biolog 读数系统读取数据。具体参照 Classen 等^[17-18]的方法。

2.6 数据统计分析

(1) 小鼠肠道微生物的代谢活性用每孔颜色平均变化率(AWCD)来描述, 计算公式如下:

$$AWCD = \sum (C_i - R) / 31$$

式中, C_i 为各碳源孔在 590 nm 下的吸光度值与 750 nm 下吸光度值的差值; R 为 Eco 板对照孔 A1 的吸光度值, Biolog Eco 板的 C 源数目为 31^[19]。

(2) 利用各样品培养 72 h 的数据, 计算其微生物多样性的 Shannon 指数(H')、Shannon 均匀度(E)、Simpson 指数($1/D$)和 McIntosh 指数(U)。计算方法参照 Magurran^[20]。

Shannon 指数(H')

$$H' = - \sum (P_i \ln P_i)$$

式中, $P_i = (C_i - R) / \sum (C_i - R)$, 表示有碳源的孔与对照孔 A1 的光密度值之差与整板总差的比值。

Shannon 均匀度(E)

$$E = H' / \ln S$$

式中, S 表示碳源代谢孔的数目 ($C_i - R > 0$, 则表示该孔碳源被利用, 该孔即为反应孔)。

Simpson 指数($1/D$)

$$D = \sum \frac{(n_i(n_i - 1))}{(N(N - 1))}$$

式中, n_i 是第 i 孔的相对吸光度值 ($C_i - R$), N 是相对吸光度值的总和 ($\sum (C_i - R)$), 同时, 为防止出现负值, 需将数据扩大 1000 倍。

McIntosh 指数(U)

$$U = \sqrt{\sum (n_i^2)}$$

数据用 Microsoft Excel 2003 计算 AWCD 值并作图、DPS v7.05 进行 T 检验、SPSS16.0 软件系统进行聚类分析和主成分分析, 所有数据均为 3 次重复的平均值。

3 结果与分析

3.1 超微七味白术散对小鼠肠道微生物 AWCD 的影响

平均颜色变化率(AWCD)反映微生物群落代谢的总体活性, 其值越大, 活性越高; 反之, 活性越低^[21]。由图 1 可知, 在厌氧培养的 4—24 h 内, 各组的 AWCD 值变化不大, 且各组之间的差别不明显。在 24 h 之后, 各组的 AWCD 值均急剧上升, 表明小鼠肠道厌氧和兼性厌氧微生物活性随培养时间的延长在不断增加。培养 36 h 时, 模型组的 AWCD 值最小, 正常组的 AWCD 值最大, 两个治疗组的 AWCD 值则比较接近, 随后 1/2 剂量超微汤药治疗组 AWCD 值急剧增加, 48 h 时其值超过正常组, 位居第一, 其次是正常组, 而模型组和传统汤药治疗组则比较接近。72 h 后各组 AWCD 值的大小为: 1/2 剂量超微汤药治疗组 > 正常组 > 传统汤药治疗组 > 模型组, 直至培养 120 h, 说明 1/2 剂量超微汤药治疗组小鼠肠道厌氧和兼性厌氧微生物群落代谢的总体活性最高, 而模型组的则最低。

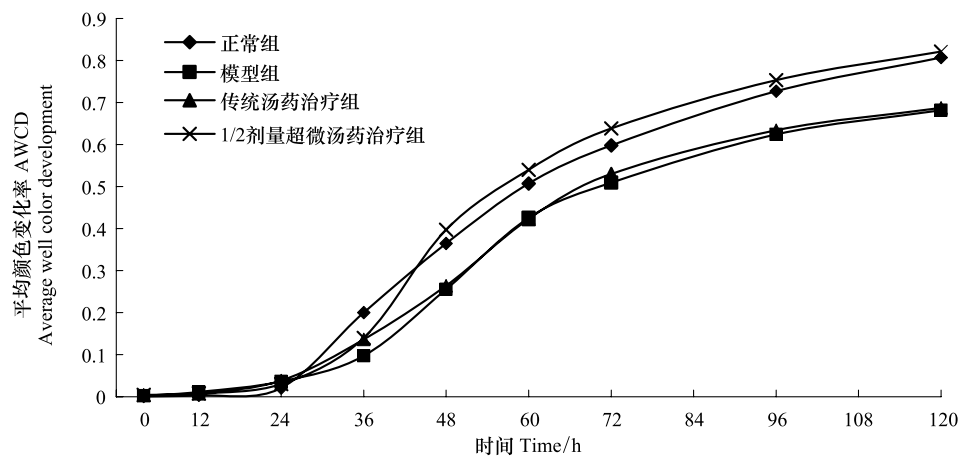


图1 不同组小鼠肠道微生物 AWCD 随厌氧培养时间的变化

Fig.1 Changes of intestinal microorganisms AWCD in mice at different groups with culturing times

3.2 超微七味白术散对小鼠肠道微生物多样性的影响

Shannon 指数表示相同情况下各个生态系统微生物群落利用碳源的多与少, Shannon 均匀度指数则包括丰富度和种类中个体分布的均匀性。Simpson 指数和 McIntosh 指数是评估某些最常见种的优势度和均匀度的指数。由表 1 可知, Shannon 指数和 Simpson 指数均为正常组最大, 且与其它 3 组差异极显著; Shannon 均匀度和 McIntosh 指数为 1/2 剂量超微汤药治疗组最大, 且都与模型组差异极显著; 除 Shannon 指数外其余各指数均为模型组最小, 且都与正常组和 1/2 剂量超微汤药治疗组差异显著或极显著; Shannon 指数最小为传统汤药治疗组, 且与其余各组差异极显著。抗生素建立小鼠菌群失调模型, 使肠道微生物的结构和数量发生变化, 导致模型组小鼠肠道微生物 Shannon 均匀度、Simpson 指数和 McIntosh 指数均显著小于正常组。七味白术散对肠道微生物有很好的调控作用, 1/2 剂量超微汤药对肠道微生物的调控疗效明显好于传统汤药, 可能与该复方中有效成分的溶出率有关^[14]。

表 1 不同组小鼠肠道微生物的多样性和均匀度指数

Table 1 The diversity and evenness indices of intestinal microorganisms in mice at different groups

组别 Groups	Shannon 指数 Shannon index (H')	Shannon 均匀度 Shannon evenness (E)	Simpson 指数 Simpson index ($1/D$)	McIntosh 指数 McIntosh index (U)
正常组 The normal group	3.1248±0.094	0.9481±0.0028	20.9280±0.2512	4.2586±0.0935
模型组 The model group	2.9244±0.0091A	0.9202±0.0029A	16.0906±0.7153A	4.0075±0.0800a
传统汤药治疗组 The traditional decoction group	2.8835±0.0058AB	0.9328±0.0019AB	16.1606±0.1316A	4.1698±0.1303
1/2 剂量超微汤药治疗组 The 1/2 volume of ultra-micro powder group	3.0908±0.0082ABC	0.9486±0.0025BC	20.0372±0.1652ABC	4.5658±0.0890aBc

与正常组相比, a: $P < 0.05$, A: $P < 0.01$; 与模型组相比, b: $P < 0.05$, B: $P < 0.01$; 与传统汤药组相比, c: $P < 0.05$, C: $P < 0.01$

3.3 不同组小鼠肠道微生物群落代谢变化的聚类分析

Biolog Eco 板的碳源一般按照化学性质可分: 糖类、氨基酸类、聚合物类、羧酸类、胺类和其他化合物, 共 6 大类^[16,22]。经抗生素造模和七味白术散治疗, 小鼠肠道微生物群落发生了复杂的变化, 使传统的化学分类无法反映微生物群落对不同碳源的利用情况。由图 2 可知, 当聚类距离 ≤ 5 时, 正常组的碳源被聚为 5 类, 模型组的碳源被聚为 4 类, 传统汤药治疗组和 1/2 剂量超微汤药治疗组的碳源被聚为 3 类, 可见造模后治疗与否所导致的小鼠肠道微生物群落对碳源的利用有很大区别。显然造模后, 模型组小鼠肠道微生物对碳源的利用情况比较单一, 而经过七味白术散两种汤药的治疗, 对碳源的利用就相对比较多样化, 可见七味白术散的治疗

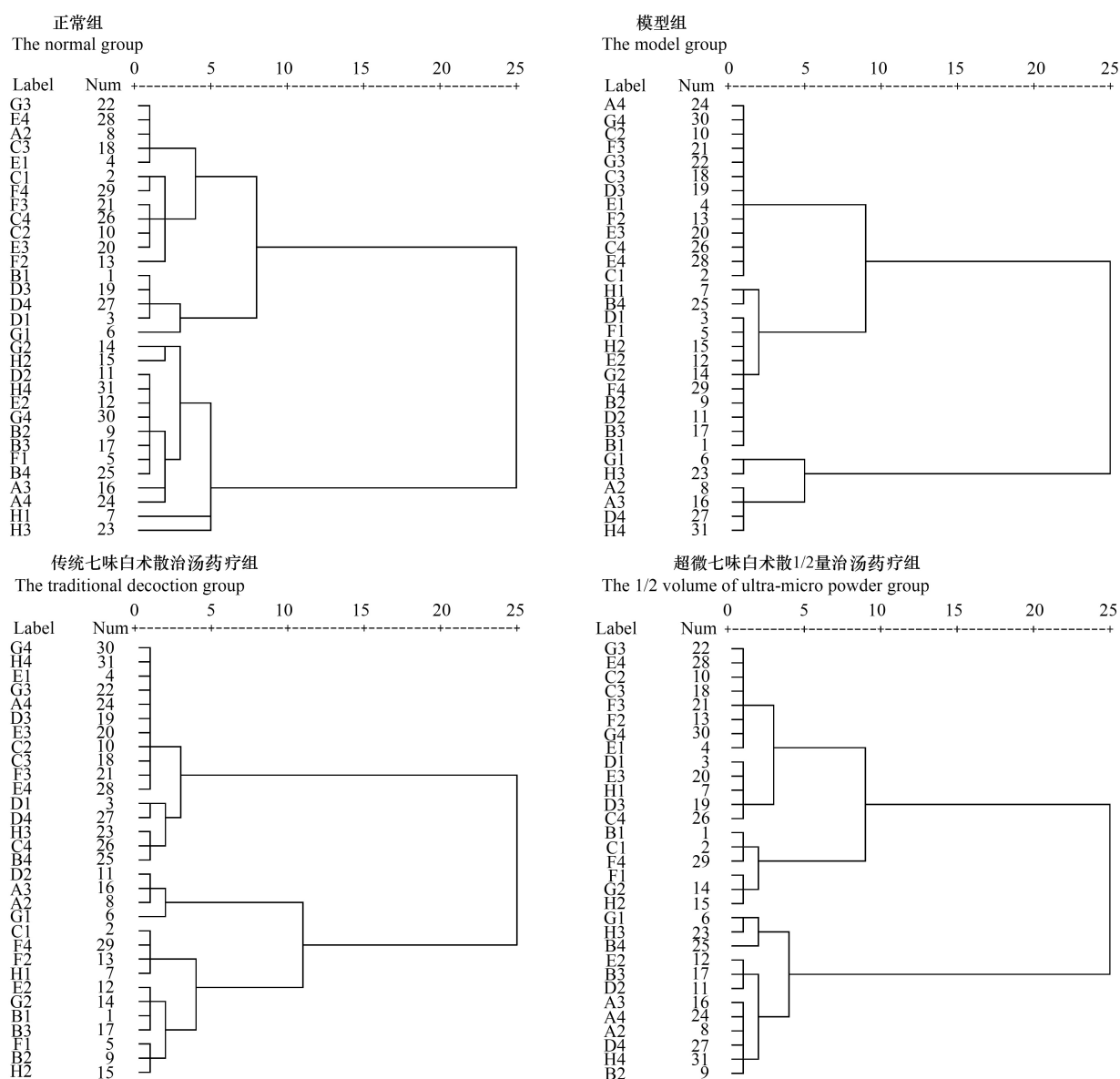


图2 不同组小鼠肠道微生物碳源代谢的聚类分析图

Fig.2 Dendrogram from average linkage cluster between carbon substrates metabolized by intestinal microbiota in mice of different groups

效果比较明显。各组均有 D-木糖、D-半乳糖醛酸和 N-乙酰-D 葡萄糖氨聚为同一类,与正常组相比,模型组还有腐胺、苯乙胺、D-半乳糖 γ 内酯和 L-精氨酸未聚在该类,传统汤药治疗组还有腐胺、苯乙胺、D-半乳糖 γ 内酯、L-精氨酸、L-天门冬酰胺和 D-甘露醇未聚在该类,1/2 剂量超微汤药治疗组则有苯乙胺、1-磷酸葡萄糖、D, L- α -磷酸甘油和肝糖未聚在该类。在正常组中, β -甲基-D-葡萄糖苷、甘氨酸-L-谷氨酸与 α -丁酮酸、L-苏氨酸等 10 种碳源一起被聚为同一类,而在其它 3 个组中,该两种碳源均未聚为该类的,且 2 个治疗组还同有吐温 40 未聚为该类。在模型组和 1/2 剂量超微汤药治疗组 D-苹果酸和 D-纤维二糖聚为同一类,而在正常组和传统汤药治疗组则未聚为同一类,尤其在正常组, D-苹果酸被单独聚为一类。在正常组中, α -D-乳糖被单独聚为一类,而在其它 3 组中, α -D-乳糖均与其它多种碳源聚为同一类,尤其在模型组和传统汤药治疗组中,同有 α -D-乳糖、肝糖等共 9 种碳源聚为同一类,与 1/2 剂量超微汤药治疗组不同。

当聚类距离 ≤ 10 时,正常组、模型组和 1/2 剂量超微汤药治疗组的碳源均被聚为 2 类;传统汤药治疗组的碳源则被聚为 3 类,且与聚类距离 ≤ 5 时的聚类结果一样。模型组和 1/2 剂量超微汤药治疗组中 D-纤维二

糖、D-苹果酸、 β -甲基-D-葡萄糖苷、D-半乳糖 γ 内酯、L-丝氨酸和腐胺共 6 种碳源被聚为一类。在正常组和传统汤药组中,该 6 种碳源分别被聚为 2 类。正常组中,D-半乳糖 γ 内酯、D-苹果酸和腐胺一类, β -甲基-D-葡萄糖苷、L-丝氨酸和 D-纤维二糖为一类;传统汤药组中,D-苹果酸、L-丝氨酸和腐胺一类,D-纤维二糖、 β -甲基-D-葡萄糖苷和 D-半乳糖 γ 内酯为一类。

3.4 不同组小鼠肠道微生物群落代谢变化的主成分分析

Biolog Eco 的数据显示,小鼠肠道微生物对 Eco 板上的绝大多数碳源都具有代谢能力,但是经统计分析发现,不同组别中某些碳源的吸光度差异明显,这说明,不同小鼠肠道微生物对碳源的利用能力是不同的。为了进一步了解七味白术散对小鼠肠道微生物群落代谢能力的影响,对 Biolog 所得数据实施主成分分析(PCA)。提取 4 个组别中的数据,通过分析可知,正常组、模型组、传统汤药组和 1/2 剂量超微汤剂组中,成分 1 的方差贡献率分别为:61.68%、57.71%、54.02%和 60.46%。

提取 31 种碳源在 2 个主成分上的载荷图来分析这 31 种碳源在 4 个组别中的代谢特点。由图 3 可知,成分 1 的方差贡献率为 46.22%,成分 2 的方差贡献率为 36.83%。正常组中 PC1 在 D-木糖、吐温 80、肝糖、2-羟基苯甲酸和 α -丁酮酸等碳源种类上有较高的载荷,表明在正常组中这些碳源对 PC1 的贡献率比较大。模型组中 PC1 在 D-纤维二糖、 α -D-乳糖、D-纤维二糖、 α -D-乳糖和腐胺等碳源上有较高的载荷。传统汤药治疗组中 PC1 在 β -甲基-D-葡萄糖苷、D-甘露醇、4-羟基苯甲酸、衣康酸和 L-苏氨酸等碳源上有较高的载荷。1/2 剂量超微汤药治疗组中 PC1 在 1-磷酸-葡萄糖、 α -环式糊精、D-半乳糖酸 γ 内酯、 γ -羟丁酸和 L-苯丙氨酸等碳源上有较高的载荷。

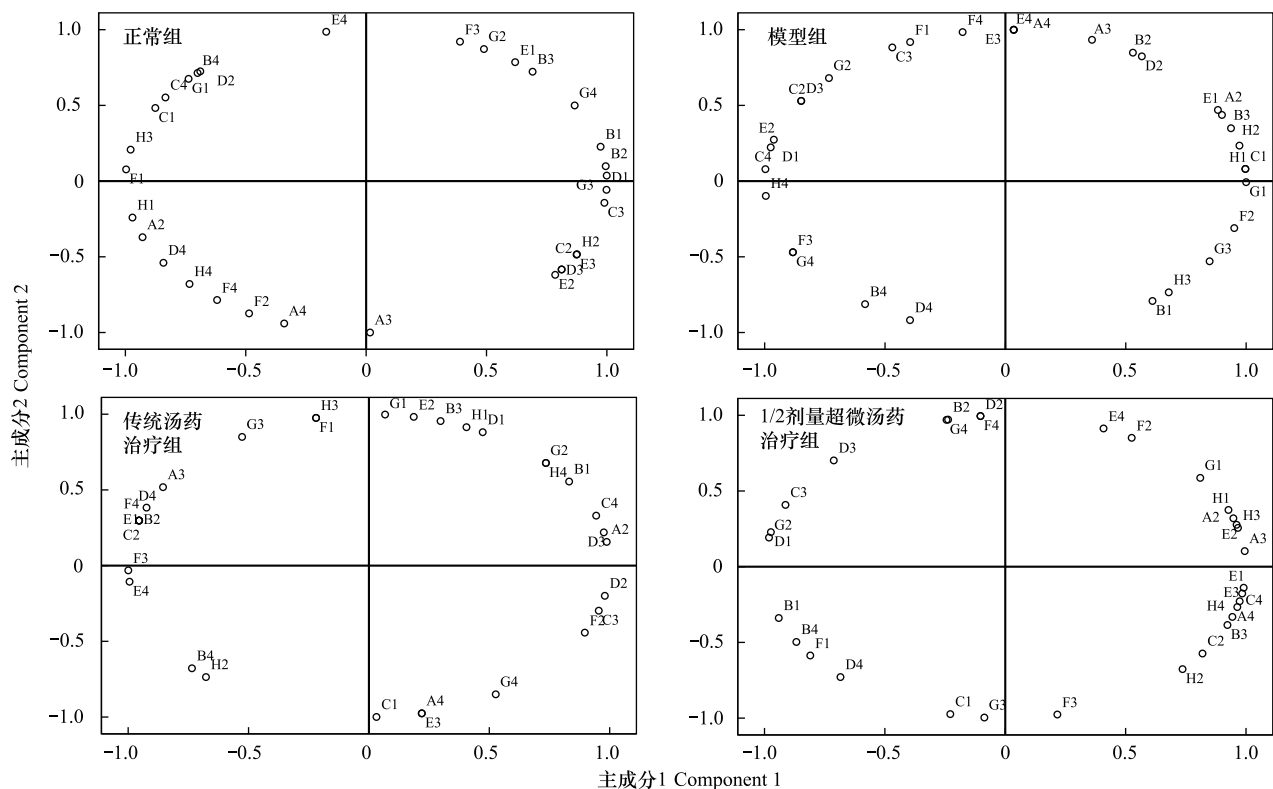


图 3 不同组小鼠肠道微生物碳源代谢的主成分分析

Fig.3 Principal component analysis of carbon substrates metabolized by intestinal microbiota in mice of different groups

正常组中 PC2 在 L-精氨酸、L-苏氨酸、D-半乳糖酸 γ 内酯、衣康酸和 D-葡萄糖胺酸)等碳源种类上有较高的载荷,表明在正常组中这些碳源对 PC2 的贡献率比较大。模型组中 PC2 在 L-精氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、D-半乳糖酸 γ 内酯和 D-半乳糖酸 γ 内酯等碳源种类上有较高的载荷。传统汤药治疗组中 PC2 在 D-纤维二糖、

N-乙酰-D-葡萄糖胺、 γ -羟丁酸、L-精氨酸和吐温 40 等碳源上有较高的载荷。1/2 剂量超微汤药治疗组中 PC2 在 D-甘露醇、衣康酸、 α -丁酮酸、甘氨酸-L-谷氨酸和吐温 40 等碳源上有较高的载荷。

如图 3 所示,D-纤维二糖在模型组中对 PC1 贡献率较大,在传统汤药治疗组和 1/2 剂量超微汤药治疗组中对 PC2 贡献率较大,而在正常组中对 PC1 和 PC2 的贡献率都不大。L-苏氨酸在正常组、模型组和 1/2 剂量超微汤药治疗组中对 PC2 贡献率较大,而在传统汤药治疗组中对 PC1 贡献率较大。衣康酸在正常组和 1/2 剂量超微汤药治疗组中对 PC2 贡献率较大,在传统汤药治疗组中对 PC1 贡献率较大,而在模型组中对 PC1 和 PC2 的贡献率都不大。肝糖在正常组中对 PC1 贡献率较大,在模型组和传统汤药治疗组中对 PC2 贡献率较大,而在 1/2 剂量超微汤药治疗组中对 PC1 和 PC2 的贡献率都不大。腐胺在模型组和 1/2 剂量超微汤药治疗组中对 PC1 贡献率较大,在正常组和传统汤药治疗组中对 PC1 和 PC2 的贡献率都不大。丙酮酸甲酯在正常组合 1/2 剂量超微汤药治疗组中对 PC1 贡献率较大,而在模型组和传统汤药治疗组中对 PC1 和 PC2 的贡献率都不大。

4 讨论

宿主与肠道微生物之间的代谢关系复杂,涉及宿主和肠道微生物生命整个过程和各个方面。肠道微生物及其基因组赋予宿主一些特殊的代谢特性,弥补宿主某些生物学不足^[23]。本研究经 BIOLOG 分析,发现模型组小鼠肠道微生物培养 72 h 后的 AWCD 值、Shannon 均匀度、Simpson 指数和 McIntosh 指数均小于正常组,其聚类分析结果最简单,主成分分析结果也与正常组区别明显,是因为抗生素对敏感革兰阴性杆菌和厌氧革兰阳性菌的抑制作用导致肠道菌群失调,直接影响肠道微生物群落的数量和结构,使得小鼠肠道微生物的某些代谢途径受到影响,导致其整体代谢活性下降。

微生物在生长过程中会产生纤维素酶、淀粉酶、蛋白酶、酯酶等多种酶,对肠道各种消化作用有重要影响。双歧杆菌相关的代谢酶系有果糖-6-磷酸磷酸激酶、半乳糖苷酶、 β -呋喃果糖苷酶、 α -葡萄糖苷酶、D-木糖异构酶、结合胆汁酸水解酶等,在其代谢过程中发挥重要作用^[24]。乳酸杆菌通过发酵碳水化合物、蛋白质、氨基酸、脂类等代谢产生乳酸、挥发性酸、过氧化氢、双乙酰及细菌素,具有抗菌作用^[25-26]。酪酸梭菌能产生 B 族维生素、维生素 K、淀粉酶等物质^[4]。有研究表明,黄芪多糖和小檗碱的复合制剂能提高蛋鸡肠道淀粉酶和蛋白酶的活性,七味白术散可使肠道纤维素酶、蛋白酶及淀粉酶活性上升^[13],促进了肠道对纤维素、蛋白质等有机化合物的利用。七味白术散复方中药化学成分复杂,功能多样,对微生物的调控作用复杂多样,能促进乳酸菌、双歧杆菌等有益菌的增殖^[13],黄酮类化合物、甘草酸等对一些特定的微生物也具有明显的抑制作用。乳酸菌、双歧杆菌、酪酸梭菌等肠道有益菌可通过生物拮抗作用,抑制艰难梭菌等抗生素相关性腹泻致病菌、大肠杆菌等条件致病菌的生长,调节菌群失衡,影响肠道菌群的代谢酶系和代谢活性^[5],使得传统汤药治疗组和 1/2 剂量超微汤药治疗组的整体代谢活性均高于模型组,Shannon 均匀度、Simpson 指数和 McIntosh 指数也都高于模型组,聚类分析和主成分分析结果也异于正常组和模型组。七味白术散通过促进肠道有益菌的增殖、抑制有害菌的生长来调控肠道微生物的平衡,改变肠道菌群的代谢活性。

AWCD 值反映微生物群落代谢的总体活性,1/2 剂量超微汤药治疗组的 AWCD 值大于传统汤药组,且表示微生物群落的数量和结构的 Shannon 指数、Shannon 均匀度、Simpson 指数和 McIntosh 指数均是 1/2 剂量超微汤药治疗组显著大于传统汤药组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),显然七味白术散的 1/2 剂量超微汤药在对肠道菌群的调控作用方面优于传统汤药,与谭周进等^[14]的研究结果一致,七味白术散超微粉更有利于其药效的发挥。中药经超微粉碎后,粉末粒径小且分布均匀,增大了其比表面积,而且细胞壁大部分被破坏,胞内有效成分的溶出阻力减小,从而提高了有效成分的溶出速度及溶出率,有利于药物的吸收,又超微粉碎可在低温状态下进行有利于保留不耐高温的生物活性成分及各种营养成分,从而提高药效^[27]。

参考文献 (References):

- [1] 武娜,朱宝利. 人体肠道微生物与健康. 科学, 2013, 65(2): 13-16.

- [2] 高巍, 刘晨黎. 双歧杆菌在胃肠道微生物区系中的作用及其粘膜附着机制. 石河子大学学报: 自然科学版, 2002, 6(4): 334-338.
- [3] Grill J P, Crociani J, Ballongue J. Characterization of fructose 6 phosphate phosphoketolases purified from bifidobacterium species. *Current Microbiology*, 1995, 31(1): 49-54.
- [4] 孙忠信, 李淑华, 杨秀云. 乳酸杆菌对仔猪肠道微生物的影响. 吉林农业科技学院学报, 2010, 9(4): 16-17.
- [5] 吕建平, 徐秀丽, 付孟莉. 酪酸梭菌的药理作用及临床应用. 临床合理用药杂志, 2010, 3(20): 159-160.
- [6] Bae E A, Shin J E, Kim D H. Metabolism of ginsenoside Re by human intestinal microflora and its estrogenic effect. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2005, 28(10): 1903-1908.
- [7] Li M, Wang B, Zhang M, Rantalainen M, Wang S, Zhou H, Zhang Y, Shen J, Pang X, Zhang M, Hua W, Yu C, Lu H, Zuo J, Su M, Qiu Y, Jia W, Xiao C, Smith ML, Yang S, Holmes E, Tang H, Zhao G, Nicholson JK, Li L, Zhao L. Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(6): 2117-2122.
- [8] Nicholson J K, Wilson I D. Understanding 'global' systems biology: Metabonomics and the continuum of metabolism. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2003, 2(8): 668-676.
- [9] Fernie A R, Trethewey R N, Krotzky A J, Willmitzer L. Metabolite profiling: From diagnostics to systems biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2004, 5(9): 763-769.
- [10] 程池, 杨梅, 李金霞, 姚粟, 胡海蓉. Biolog 微生物自动分析系统-细菌鉴定操作规程的研究. 食品与发酵工业, 2006, 32(5): 50-54.
- [11] 胡桂林, 王德良, 张雪峰, 段开红. 用 Biolog 微生物自动分析系统鉴定大曲中地衣芽孢杆菌的研究. 酿酒, 2007, 34(6): 32-33.
- [12] 柏中中, 许婷婷, 何小丹, 何冰芳. 利用 Biolog 系统进行乳酸生产菌代谢能力的快速分析. 食品与生物技术学报, 2009, 28(3): 347-351.
- [13] 谭周进, 吴海, 刘富林, 蔡莹, 蔡光先, 张华玲, 曾奥. 超微七味白术散对肠道微生物及酶活性的影响. 生态学报, 2012, 32(21): 6856-6863.
- [14] 谭周进, 张华玲, 余望怡, 周赛男, 曾奥, 蔡莹, 蔡光先. 菌群失调小鼠腹泻造模及超微中药干预过程中肠道微生物的变化. 应用与环境生物学报, 2013, 19(3): 449-453.
- [15] 曾奥, 张华玲, 谭周进, 蔡莹, 蔡光先, 周赛男. 小鼠菌群失调腹泻模型的建立及超微七味白术散的疗效. 微生物学通报, 2012, 39(9): 1341-1348.
- [16] 安韶山, 李国辉, 陈利顶. 宁南山区典型植物根际与非根际土壤微生物功能多样性. 生态学报, 2011, 31(18): 5225-5234.
- [17] Classen A T, Boyle SI, Haskins K E, Overby S T, Hart S C. Community-level physiological profiles of bacteria and fungi: Plate type and incubation temperature influences on contrasting soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 44(3): 319-328.
- [18] 刘峰, 张兰英, 刘鹏, 刘莹莹, 高松. 采用 Biolog 法分析制药废水处理工艺中微生物多样性. 中国给水排水, 2007, 23(21): 28-32.
- [19] Grove JA, Kautola H, Javdipour S, Young M M, Anderson W A. Assessment of changes in the microorganism community in a biofilter. *Biochemical Engineering Journal*, 2004, 18(2): 111-114.
- [20] Magurran A E. *Ecological Diversity and Its Measurement*. New Jersey: Princeton University Press, 1988: 43-47.
- [21] Benizri E, Amiaud B. Relationship between plants and soil microbial communities in fertilized grasslands. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37(11): 2055-2064.
- [22] 杨莺莺, 李卓佳, 梁晓华, 梁润捷, 洪敏娜, 陈永青. 芽孢杆菌对鱼池微生物群落代谢功能的影响. 微生物学杂志, 2009, 29(3): 11-17.
- [23] 刘威, 姚文, 朱伟云. 人体与肠道微生物间的互惠共生关系. 世界华人消化杂志, 2006, 14(11): 1081-1088.
- [24] 吕耀龙, 赵春杰, 刘建军. 双歧杆菌的代谢及开发前景. 乳业科学与技术, 2008, (2): 90-92.
- [25] 柴俊, 邵翠仙, 张以芳. 乳酸杆菌主要代谢产物种类及其特性. 食品工业科技, 2007, 28(8): 257-260, 264-264.
- [26] 章文明, 汪海峰, 刘建新. 乳酸杆菌益生作用机制的研究进展. 动物营养学报, 2012, 24(3): 389-396.
- [27] 谷丽丽, 张雪梅, 田莉瑛, 边艳青, 赵宝华. 中药超微粉碎技术的应用及进展. 生命科学仪器, 2008, 6(8): 49-52.