

· 基础研究 ·

养阴益气活血方对干燥综合征非肥胖糖尿病
小鼠肠道菌群的影响傅天啸¹ 王 庆² 李天一³ 陈忆莲⁴ 吴国琳¹

摘要 目的 利用 16S rRNA 高通量测序研究养阴益气活血方对干燥综合征非肥胖糖尿病 (NOD) 小鼠肠道菌群的影响。方法 选取 NOD 小鼠 24 只, 6 只同龄 Balb/c 小鼠作为对照组, NOD 小鼠随机分为中药组、中西药组、西药组及模型组, 每组 6 只。中药组灌服中药养阴益气活血煎剂 0.4 mL (含生药量 1.125 g/mL); 西药组灌服羟氯喹 0.4 mL (3 mg/mL); 中西药组灌服中药、羟氯喹各 0.4 mL; 模型组和对照组每只灌服去离子水 0.4 mL。给药 8 周后取各组小鼠粪便, 进行 16S rRNA 高通量测序检测肠道菌群。结果 经 16S rRNA 测序后共得到 3 867 个操作分类单元, 10 个门, 69 个属。与对照组比较, 模型组的 Chao、Ace、Shannon 指数明显降低, Simpson 指数增加 ($P<0.05$); 与模型组比较, 中西药组 Chao、Ace、Shannon 指数明显升高, Simpson 指数减少 ($P<0.05$)。在门水平, 拟杆菌门与厚壁菌门为优势菌群 (分别占总样本的 47.29%、41.17%), 拟杆菌门水平各组间无明显统计学差异; 中药组与对照组厚壁杆菌门水平均高于其他组 ($P<0.05$)。在属水平, 中药组的乳酸杆菌属、*Incertae* 属和 *Candidatus Saccharimonas* 属的物种丰度明显高于模型组, 且拟杆菌属丰度明显降低 ($P<0.05$)。结论 养阴益气活血方能提高肠道微生物多样性及物种丰度, 增加 NOD 小鼠肠道益生菌, 抑制优势有害菌生长, 提示其可能通过调节肠道的微生态结构发挥治疗干燥综合征的作用。

关键词 养阴益气活血方; 干燥综合征; 肠道菌群; 非肥胖糖尿病; 16S rRNA

Effects of Yangyin Yiqi Huoxue Recipe on Intestinal Flora of NOD Mice with Sjögren's Syndrome

FU Tian-xiao¹, WANG Qing², LI Tian-yi³, CHEN Yi-lian⁴, and WU Guo-lin¹ 1 Department of Chinese Medicine, First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou (310003); 2 General Internal Department, Tongde Hospital of Zhejiang Provincial, Hangzhou (310012); 3 Functional Laboratory of Basic Medical College, Zhejiang University of Chinese Medicine, Hangzhou (310053); 4 Department of Rheumatology, Jiaxing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang (314033)

ABSTRACT Objective To study the effects of Yangyin Yiqi Huoxue Recipe on intestinal flora of NOD mice with Sjögren's syndrome (SS) by using high-throughput sequencing of 16S rRNA. **Methods** A total of 24 NOD mice were randomly divided into 4 groups, i.e. Chinese medicine group, Western medicine group, Chinese and Western medicine group and model group, 6 in each group. And 6 Balb/c mice with same age were selected as control group. Chinese medicine group was given 0.4 mL of Yangyin Yiqi Huoxue Recipe (containing 1.125 g/mL of crude drug), while 0.4 mL of hydroxychloroquine (3 mg/mL) in Western medicine group. Chinese and Western medicine group was intervened by 0.4 mL of Chinese medicine and hydroxychloroquine. The model group and the control group were treated with 0.4 mL of deionized water. After 8 weeks, the feces of mice were collected to detect gut microbiota by applying 16S rRNA high-throughput sequencing. **Results** Totally 3 867 operational taxonomic units were obtained, 10 phylums, and 69 genres by using 16S rRNA sequencing. Compared with the

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目 (No. 81473604); 浙江省自然科学基金资助项目 (No. LY19H270013)

作者单位: 1. 浙江大学医学院附属第一医院中医科 (杭州 310003); 2. 浙江省立同德医院综合内科 (杭州 310012); 3. 浙江中医药大学基础医学院机能实验室 (杭州 310053); 4. 嘉兴市中医院风湿科 (浙江 314033)

通讯作者: 吴国琳, Tel: 0571-87236341, E-mail: wuguolin28@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20201202.391

control group, the Chao, Ace and Shannon indexes of the model group were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, the Chao, Ace and Shannon indexes of the Chinese and Western medicine groups were obviously increased, and the Simpson index was significantly decreased ($P<0.05$). At the level of phylum, *Bacteroidetes* and *Firmicutes* were the dominant flora (accounting for 47.29% and 41.17% of the total samples, respectively). At the same time, there was no remarkable difference among *Bacteroidetes*. The level of *Firmicutes* was higher in both the Chinese medicine group and the control group ($P<0.05$). At genus level, the species abundance of *Lactobacillus*, *Incertae* and *Candidatus Saccharimonas* in Chinese medicine group was greatly higher than the model group, and *Bacteroides* was extremely lower than the model group ($P<0.05$). **Conclusion** Yangyin Yiqi Huoxue Recipe can improve the diversity of intestinal microorganisms and species abundance, increase intestinal probiotics of NOD mice, and inhibit the growth of dominant harmful bacteria, which indicated Yangyin Yiqi Huoxue Recipe may play a role in treating SS by adjusting the gut microbiota structure.

KEYWORDS Yangyin Yiqi Huoxue Recipe; Sjögren's syndrome; intestinal flora; no obesity diabetes; 16S rRNA

干燥综合征 (Sjögren's syndrome, SS) 是一组高度异质性的系统性自身免疫病, 临床上多累及唾液腺和泪腺等外分泌腺, 严重者可出现多系统损伤。SS 的病因及发病机制目前尚未完全明确, 近年来肠道微生物与疾病的关系备受重视, 肠道中近 1 500 种细菌被发现与代谢性疾病、消化道疾病、自身免疫相关性疾病等的发病机制相关, 通过干预肠道内的菌群可以治疗甚至预防疾病^[1]。SS 目前无特效方法, 课题组前期临床运用养阴益气活血方治疗 SS 患者取得确切疗效, 不仅能缓解临床症状和病情, 同时还能调节免疫功能, 改善 SS 患者生活质量^[2,3]。本研究以目前公认的 SS 动物模型非肥胖糖尿病 (no obesity diabetes, NOD) 小鼠为研究对象^[4], 经养阴益气活血方干预, 利用 16S rRNA 高通量测序法研究 NOD 小鼠肠道菌群的变化, 从肠道微生态角度探讨养阴益气活血方治疗 SS 的可能机制。

材料与方法

1 动物 NOD 小鼠 24 只, 8 周龄, 6 只同龄 Balb/c 小鼠, 雌性, SPF 级, 体重 (21.51 ± 1.35) g, 于无特殊病菌的 SPF 级动物室 (温度 25 °C, 湿度 46%RH), 恒温条件下喂养。所有实验动物直接购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司 (合格证号: 20130016000707、20130016000706), 饲养于浙江中医药大学动物实验中心。实验方案经浙江大学医学院附属第一医院实验动物伦理委员会批准 (No. 2018 实动快审第 048 号)。

2 药物 中药养阴益气活血方 (太子参 15 g 五味子 9 g 山茱萸 15 g 女贞子 15 g 红景天 15 g 肿节风 10 g 丹参 15 g 白芍 10 g 黄精 10 g 山药 30 g 乌梅 6 g), 所有中药饮片由浙江大学医学

院附属第一医院中药房提供, 在浙江中医药大学实验室煎煮、过滤, 浓缩成含生药 1.125 g/mL (按照成人和小鼠等效剂量换算, 60 kg 人与 20 g 小鼠之间的换算比例为 1:10)。硫酸羟氯喹片: 由上海上药中西制药有限公司生产 (规格: 0.1 g/片), 批号: H19990263, 用蒸馏水稀释成含生药量 3 mg/mL 的混悬液。

3 试剂与仪器 KAPA HiFi Hotstart PCR Kit (批号: KK2602, KAPA Biosystems 公司)、QIAquick Gel Extraction Kit (批号: DP209-02Qiagen 公司)、AGENCOURT AMPURE XP Kit (批号: A63881, Beckman Coulter 公司)、KAPA Library Quantification Kit Illumina Platforms (批号: KK4824, KAPA Biosystems 公司)、T100 Thermal Cycler PCR 仪 (型号: 1861096, Bio-Rad 公司)、Qubit Fluorometers 荧光定量仪 (型号: Q33216, Thermo Fisher Scientific 公司)、Qseq100 DNA 分析仪 (型号: Qsep100, Bioptic 公司)、LightCycler 96 实时定量 PCR 仪 (型号: 96, Roche 公司)、MiSeq System 平台 (型号: MS, Illumina 公司)。

4 动物分组及给药方法 24 只 8 周龄 NOD 小鼠适应性饲养 1 周后, 按随机数字表法分为 4 组, 即中药组 (灌服养阴益气活血方 0.4 mL, 100 g/kg, 相当于临床人用药剂量 9 倍), 西药组 (灌服羟氯喹 0.4 mL, 60 mg/kg, 相当于临床人用药剂量 9 倍), 中西药组 (灌服养阴益气活血方 50 g/kg、羟氯喹 60 mg/kg, 各 0.4 mL), 模型组 (灌服去离子水 0.4 mL), 每组 6 只。同时选取 6 只同龄 Balb/c 小鼠作为对照组 (灌服去离子水 0.4 mL)。实验期间各组小鼠自由进食、饮水, 持续饲养、灌胃 8 周。

5 小鼠粪便标本采集及处理 各组小鼠饲养、

给药 8 周,在末次给药后第 2 天将小鼠处死,立即解剖取出其结肠,分别采集每只小鼠肠道组织及肠道内的新鲜粪便,置于无菌试管内,每个标本在 30 min 内完成菌群接种,然后迅速置于 -80°C 超低温冰箱内保存备用检测。

6 肠道菌群的 16S rRNA 测序

6.1 DNA 提取与 PCR 扩增 利用 DNA 提取试剂盒,依照试剂盒说明书步骤提取小鼠粪便的基因组 DNA。按指定测序区域,合成带有 barcode 的引物,进行细菌 16S rRNA 基 V3~4 区的扩增,细菌引物基因为: 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3', 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3', 引物大小为 450 bp。扩增条件如下: 95°C 初始变性 2 min, 95°C 变性 30 s, 25 个循环, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s,并在 72°C 下最后延伸 5 min。反应体系如下: $2\times$ KAPA HiF Hot Start Ready Mix $12.5\mu\text{L}$ 、上下游引物 25 mmol/L 各 $0.25\mu\text{L}$ 、DNA 模板 $1\mu\text{L}$ 、 ddH_2O $9.5\mu\text{L}$ 。每个样品 2 个重复。

6.2 纯化质检与测序 用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳,对目的片段按照 QIAquick Gel Extraction Kit 操作流程进行切胶回收,使用 Qubit Fluorometer 检测文库 DNA 质量浓度,大于 $1.0\text{ ng}/\mu\text{L}$ 为合格;使用 Qseq100 DNA 检测文库 DNA 长度分布,符合目的片段长度、单一峰、无接头峰和大片段峰则认为合格;使用 KAPA Library Quantification Kit 对文库 DNA 的摩尔浓度进行定量,以此作为文库混合的标准。将文库混合、变性后,加入到 IlluminaMiSeq 测序平台进行高通量并行测序,测序时对文库两端分别进行测序,即双端 (paired-end, PE) 测序。

6.3 序列拼接及数据过滤 Flash 软件拼接 PE 序列,得到拼接好的序列文件及序列长度分布,使用 Mothur 进行过滤,过滤原则如下:去除平均质量得分 ≤ 20 的序列,去除含 N 的序列,去除同聚体过长 ($>10\text{ bp}$) 的序列;去除引物错配过多 ($\geq 4\text{ bp}$) 的序列,并去除引物序列;去除过短 ($\leq 200\text{ bp}$) 和过长 ($\geq 500\text{ bp}$) 的序列;使用 Uchime 软件以 Gold 数据集作为参比,去除嵌合体。

6.4 操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU) 聚类及分配物种单元 根据序列相似度将序列聚类为 OTU,相似度阈值为 97%,聚类时将稀有序列弃去,生成 OTU-taxa 表格,计算 Ace、Chao、Shannon 和 Simpson 指数。使用 RDP 分类器以 SILVA 数据库为参比,对 OTU 序列进行系统分类,分类基于 Bergey's taxonomy,分为界

(kingdom)、门 (phylum)、纲 (class)、目 (order)、科 (family)、属 (genus) 6 级。

7 统计学方法 使用 Metastats 检验门、属水平物种相对丰度的差异,计算组间 P 值和 Q 值。所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 19.0 统计软件分析。2 组间比较采用 T 检验进行比较;多组间比较时,当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 各组测序数据统计 (表 1, 图 1) 采用 Illumina MiSeq 测序平台对小鼠肠道粪便样本进行高通量测序得到最终的优质序列:范围在 233 434~378 201 条,优质序列与有效序列比值均在 95% 以上,其平均长度范围在 401~428 bp。根据序列相似度将序列聚类为 OTU,各处理组得到的 OTU 数量范围为 520~1 107。

表 1 小鼠 OTU 数量及序列数 (个)

组别/合计	n	有效序列	优质序列	OTU 数量
对照	6	245 261	233 434	1 107
模型	6	265 057	259 065	712
中药	6	287 871	279 894	520
西药	6	326 389	318 783	630
中西药	6	390 708	378 201	898
合计	24	1 515 286	1 469 377	3 867

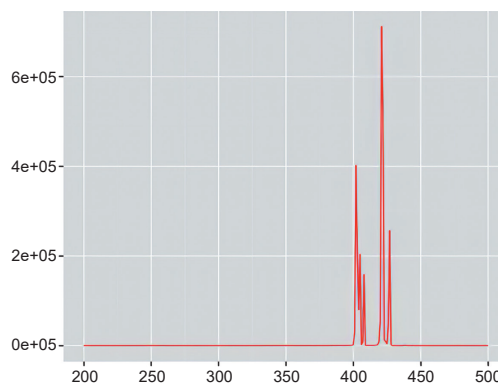


图 1 过滤后各组序列长度分布

2 各组小鼠肠道微生物丰度分布曲线 (图 2) 对各样本的 OTU 丰度大小排序,取 $\log_2$ 的对数值作丰度分布曲线图,样本丰富度基本集中在 500~1 000 之间,且曲线末端较平,说明物种分布均匀,样本可用于多样性分析。

3 各组小鼠肠道菌群 Alpha 多样性指数分析 (表 2, 图 3) 通过分析丰度 Chao 和 Ace 指数:与

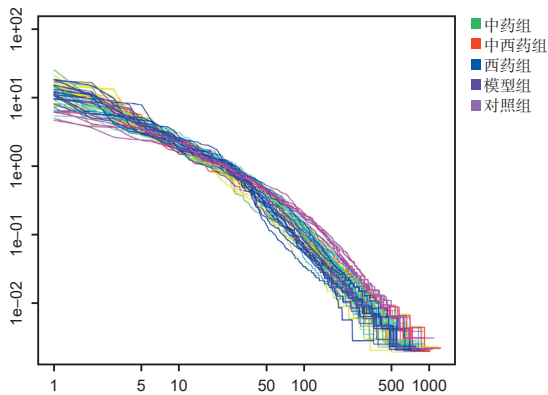


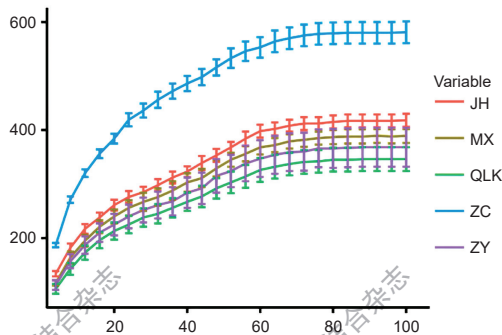
图 2 各组小鼠肠道生物丰度曲线

对照组比较, 模型组 Chao 与 Ace 指数均显著降低 ($P<0.05$), 与模型组比较, 中西药组 Chao 与 Ace 指数均显著升高 ($P<0.05$), 而西药组与中药组差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。分析多样性 Shannon 和 Simpson 指数: 与对照组比较, 模型组 Shannon 指数减少, Simpson 指数增加 ($P<0.05$)。与模型组比较, 中西药组 Shannon 指数增加, Simpson 指数减少 ($P<0.05$), 而西药组与中药组差异无统计学意义 ($P>0.05$)。从稀释曲线图中发现, 当样品测序数量超过总量 70% 时, 稀释曲线趋于平行, 不再明显上升。

表 2 各组小鼠肠道菌群 Alpha 指数分析 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	Chao 指数	Ace 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
对照	1 357.10 $\pm$ 148.57	1 450.94 $\pm$ 153.07	4.93 $\pm$ 0.15	0.017 $\pm$ 0.00
模型	929.60 $\pm$ 122.15*	1 025.19 $\pm$ 73.90*	3.99 $\pm$ 0.19*	0.047 $\pm$ 0.01*
中药	922.06 $\pm$ 193.73	1 004.02 $\pm$ 195.74	4.11 $\pm$ 0.34	0.047 $\pm$ 0.02
西药	997.11 $\pm$ 247.89	1 016.46 $\pm$ 206.29	3.99 $\pm$ 0.34	0.048 $\pm$ 0.02
中西药	1 173.31 $\pm$ 184.74 Δ	1 264.20 $\pm$ 117.70 Δ	4.38 $\pm$ 0.18 Δ	0.033 $\pm$ 0.00 Δ

注: 与对照组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, $\Delta P<0.05$



注: JH 为中西药组; MX 为模型组; QLK 为西药组; ZC 为对照组; ZY 为中药组

图 3 各组小鼠肠道物种稀释曲线

4 小鼠肠道菌群结构丰度分析

4.1 门水平肠道菌群结构影响 (图 4) 从样本中分析得到的生物共有 10 个门, 69 个属。10 个门如下: 广古生菌门、放线菌门、拟杆菌门、Candidate division TM7 门、蓝菌门、脱铁杆菌门、厚壁菌门、变形菌门、软壁菌门、疣微菌门。拟杆菌门与厚壁菌门占总样本 88.46%, 其中拟杆菌门占 47.29%, 厚壁菌门占 41.17%, 为优势菌群。在拟杆菌门水平, 模型组和西药组占比最高, 分别为 55.06% 和 52.35%, 各组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。在厚壁杆菌门水平, 中药组与对照组占比最高, 分别为 50.36% 和 46.54%。与对照组比较, 模型组与西药组丰度明显减少 ($P<0.05$)。在疣微菌门水平, 中西药组和模型组的疣微菌门占比最高, 分别为 10.57% 和 9.75%。与中药组比较, 中西药组丰度明显升高 ($P<0.05$)。在变形菌门、广古生菌门等余下门中, 各组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

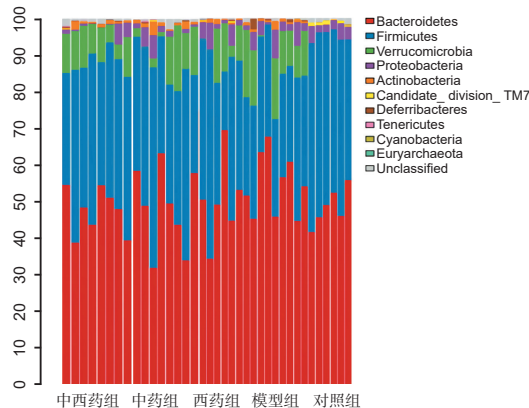
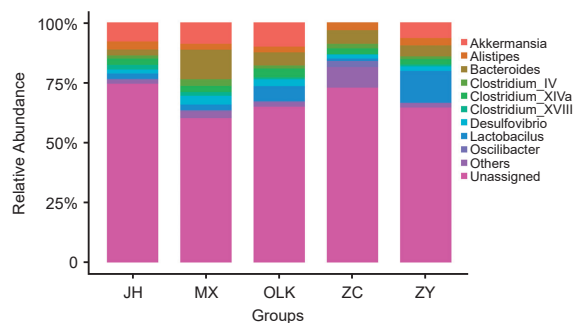


图 4 各组小鼠门水平肠道菌群结构

4.2 属水平肠道菌群结构影响 (图 5) 在属水平上, 进行两两组间比较: 与对照组比较, 模型组显著提高拟杆菌门的拟杆菌属、疣微菌门的阿克曼氏菌属的物种丰度; 中药组显著提高厚壁菌门的乳酸杆菌属、*Incertae* 属, Candidate division TM7 门的 *Candidatus Saccharimonas* 属的物种丰度; 显著降低了厚壁菌门的假解黄酮菌属、颤螺旋菌属的物种丰度, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。与模型组比较, 中药组显著提高厚壁菌门的乳酸杆菌属、*Incertae* 属, Candidate division TM7 门的 *Candidatus Saccharimonas* 属的物种丰度; 显著降低拟杆菌门的拟杆菌属的物种丰度, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

讨论

SS 全球患病率为 0.1%~0.6%, 我国患病率为



注: JH 为中西药组; MX 为模型组; OLK 为西药组; ZC 为对照组;

ZY 为中药组

图 5 各组小鼠属水平肠道菌群结构

0.77%, 好发于 40~55 岁女性, 男女比例为 1:9^[5]。目前 SS 发病机制不明确, 西医大多采用局部缓解外分泌腺干燥症状作替代治疗, 当组织脏器受累时加用激素或免疫抑制剂如羟氯喹来延缓自身免疫反应^[6], 但西药尤其激素等存在不良反应多、病情迁延不愈、部分易复发等缺点。

SS 属于中医学“燥痹”范畴, 课题组通过长期研究认为 SS 患者辨证多以气阴两虚为主, 兼有血瘀, 运用养阴益气活血方(太子参、五味子、山茱萸、女贞子、红景天、肿节风、丹参、白芍、黄精、山药、乌梅等组成)治疗 SS 取得显著疗效, 前期研究发现该方能减轻 NOD 小鼠颌下腺组织病理损害, 改善小鼠颌下腺 Th1/Th2 免疫平衡和 Fas、FasL 及其 mRNA 表达, 减少细胞凋亡^[7,8]。近年来, 肠道微生态与免疫的相关研究倍受关注, 在系统性红斑狼疮、强直性脊柱炎等多种免疫疾病中发现, 肠道微生态可激活大量炎性因子从而影响局部肠黏膜屏障, 阻碍正常黏膜免疫功能^[9]。而临床上中药以口服为主, 易被肠道菌群代谢酶转化成新的活性产物发挥作用, 中药提取物多糖类、皂苷类、单药大黄、白芍等及复方均被发现有助于维持肠道微生态的平衡, 抑制条件致病菌从而调节肠道菌群稳定结构^[10-12]。因此通过研究 SS 肠道微生态的变化, 有可能揭示中药治疗 SS 的作用机制。

NOD 小鼠是目前较公认的 SS 实验动物模型, 其颌下腺病理变化与人 SS 颌下腺病理高度相似^[4], Illumina MiSeq 测序法也是目前应用于肠道微生物多样性及结构改变的检测分析方法^[13]。本实验中样本 Coverage 指数均在 0.99 以上且接近 1, 可见测序样本细菌覆盖率高、深度适中、菌种较为全面, 满足样品中细菌多样性分析的需要。研究发现对照组 OTU 数量、Chao、ACE、Shannon 指数明显高于其他组, Simpson 指数明显低于其他组, 表明正常小鼠肠道

微生物丰度最高且多样性最大, 同时也说明 NOD 小鼠确实存在肠道菌群失调。中西药组 Chao、ACE、Shannon 指数明显高于模型组, Simpson 指数明显低于模型组, 与正常组与模型组的对比结果一致, 而西药组对比模型组差异不明显, 表明西药基础上加入中药养阴益气活血方后能更大程度提高生物丰度及肠道菌群多样性。肠道菌群的多样性又是促进药物营养物吸收、维持新陈代谢、调节免疫屏障的基础, 多样性高低会妨碍宿主固有免疫, 从而影响机体对疾病的反应^[14]。可推测养阴益气活血方治疗 SS 或与丰富肠道菌群多样性有关。

在门水平, 拟杆菌门与厚壁菌门占总样本 88.46%, 拟杆菌门水平各组间无明显统计学差异; 厚壁菌门水平, 中药组与对照组的占比最高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。在属水平, 中药组厚壁菌门的乳酸杆菌属、*Incertae* 属, *Candidatus TM7* 门的 *Candidatus Saccharimonas* 属的物种丰度明显高于模型组, 且拟杆菌门的拟杆菌属丰度明显降低 ($P<0.05$)。

在分析肠道菌群结构的门水平发现, 占最大优势的两个门分别为: 拟杆菌门 (47.29%) 和厚壁菌门 (41.17%)。这与 De Paiva CS 等^[15]研究发现 SS 患者肠道中的优势菌群是拟杆菌门与厚壁菌门的结果一致。而厚壁菌门和拟杆菌门间的比值 F/B 高低与肠道菌群成分存在显著相关性, 常被用来评价肠道微生物菌群失调程度^[16,17]。本实验研究发现拟杆菌门中占比最高的是模型组 (F/B 最低), 其次是西药组; 厚壁菌门占比最高的是中药组 (F/B 最高), 其次是对照组, 提示养阴益气活血方能提高 SS 肠道厚壁菌门与拟杆菌门间的比 F/B, 调节肠道菌群失调状态。实验还发现疣微菌门在中西药组和模型组比例均增高, 尚不能判断其对人体的利弊, 有待于进一步研究。因此从门水平分析提示发现, 在 SS 小鼠肠道中厚壁菌门被抑制, 拟杆菌门直接或间接成为条件致病菌, 促进各种炎症反应, 导致疾病发生或进展。西药羟氯喹对拟杆菌的抑制作用以及对厚壁菌的增强作用不佳, 并未能有效提高 F/B, 而养阴益气活血方干预后能一定程度调整细菌门结构, 发挥厚壁菌门主导作用。

本实验研究 SS 小鼠肠道菌群属水平发现, 模型组小鼠肠道拟杆菌属及阿克曼氏菌属明显高于对照组。阿克曼氏菌属是近年一个热门菌属, 约占疣微菌门的 83%, 占总肠道微生物的 1%~4%, 为优势菌群, 具有转化肠道上皮黏蛋白为碳源、氮源的生理功能,

可减弱肠道黏液屏障厚度^[18],阿克曼氏菌属能加剧鼠伤寒沙门氏菌诱发的肠道炎症,破坏宿主肠道黏膜的微生物平衡^[19]。而拟杆菌属升高往往和肠道菌群紊乱有关,当乳酸杆菌等有益菌减少时,肠道内竞争抑制作用削弱,条件致病菌生长占优势,拟杆菌属比例的增加,可上调细菌毒素,加重炎症因子释放^[20]。乳酸杆菌属是一种能酵解碳水化合物产生乳酸、提高内环境酸度、降低致病菌黏附、刺激免疫球蛋白产生的菌属,现多被作为益生菌用来防治代谢性疾病等。因此研究结果提示 SS 小鼠肠道阿克曼氏菌属和拟杆菌属两者可能是主要致病菌属;而中药组小鼠肠道乳酸杆菌属、*Candidatus Saccharimonas* 属显著提高,拟杆菌属减少,表明养阴益气活血方能显著提高乳酸杆菌,增加益生菌,减少致病菌。*Candidatus Saccharimonas* 属常与口腔疾病相关,能附着在口腔致病菌上,而口腔致病菌能释放一种脂肪化合物,引起多种自身免疫疾病^[21],推测养阴益气活血方能上调 *Candidatus Saccharimonas* 菌属,抑制多种口腔致病菌改善口腔症状,这有待通过口腔菌群相关研究深入探讨。

本次实验中主要的药物多以补益脾胃气血、养阴为主。现代研究表明,补益类中药及多糖类中药能调整肠道菌群失衡的状态,这些成分经口服进入肠道后能促进肠道益生菌(如双歧杆菌等)生长,益生菌及其代谢产物又间接抑制有害菌(如大肠杆菌等)的生长,实现肠道菌群平衡,而本次实验中太子参、丹参、五味子均含大量多糖成分。王琳等^[22]发现五味子多糖能够在一定程度上调节因盐酸林可霉素导致的肠道紊乱,且存在剂量效应关系,可能是由于大量多糖被有益菌利用进行代谢后产生了乳酸、乙酸等短链脂肪酸,降低了肠道 pH 值,抑制有害菌生长。相关文献报道^[23]参苓散中的补益药党参、白芍具有促进小鼠肠道菌群中双歧杆菌、乳杆菌增殖的功效。另有学者选取山药、米仁等健脾中药进行体外抑菌及灌胃溃疡性结肠炎大鼠实验,发现山药在体外同样能促进双歧杆菌和乳酸杆菌生长,也与本次实验部分结果一致。后续本课题组可进一步利用动物实验及临床研究拓展复方或单味中药对某些证型肠道微生态的动态调节作用。

本实验主要通过养阴益气活血方的干预,利用 Illumina MiSeq 测序法,比较不同组别 NOD 小鼠肠道菌群的变化,研究结果与课题组前期临床研究相一致^[24],即 SS 患者存在肠道微生态失衡,经养阴益气活血方治疗后,随着病情的好转,失衡的肠道微生

态得到改善。本研究结果显示 NOD 小鼠存在肠道微生态失调,提示 SS 发病与肠道菌群失调相关,从而表明养阴益气活血方能提高肠道微生物多样性及物种丰度,增加肠道关键益生菌,抑制优势有害菌生长,其可能通过调整肠道微生态结构、维持菌群动态平衡,发挥治疗 SS 的作用。

利益冲突:无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Clemente JC, Manasson J, Scher JU. The role of the gut microbiome in systemic inflammatory disease[J]. BMJ, 2018, 360: j5145.
- [2] Wu GL, Li TY, Fan YS, et al. Effect of Chinese herbal medicine for nourishing yin, supplementing qi, and activating blood on the Th1/Th2 immune balance in peripheral blood in patients with primary Sjögren's syndrome[J]. Chin J Integr Med, 2013, 19(9): 696-700.
- [3] Wu GL, Wu NY, Li TY, et al. Effect of Chinese herbal medicines for nourishing yin, supplementing qi, and activating blood on reproductive endocrine activity and immune functions in patients with primary Sjögren's syndrome[J]. Chin J Integr Med, 2015, 21(10): 778-783.
- [4] Inoue H, Kishimoto A, Ushikoshi-Nakayama R, et al. Resveratrol improves salivary dysfunction in a non-obese diabetic (NOD) mouse model of Sjögren's syndrome[J]. J Clin Biochem Nutr, 2016, 59(2): 107-112.
- [5] Maciel G, Crowson CS, Matteson EL, et al. Incidence and mortality of physician-diagnosed primary Sjögren syndrome: time trends over a 40-year period in a population-based US cohort[J]. Mayo Clin Proc, 2017, 92(5): 734-743.
- [6] Faizal B, Gangadharan S, Thankappan K. Comparison between sialendoscopy and conventional methods in the treatment of sialolithiasis [J]. Malays J Med Sci, 2017, 24(5): 94-100.
- [7] 吴国琳, 普兴宏, 李天一, 等. 养阴益气活血方对于干燥综合征 NOD 小鼠血清及颌下腺 Th1/Th2 免疫平衡的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(12): 1653-1657.
- [8] 吴国琳, 李天一, 卢雯雯, 等. 养阴益气活血方药对

- 干燥综合征 NOD 小鼠颌下腺 Fas/FasL 及其 mRNA 表达的影响 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38 (23): 4148-4151.
- [9] Zhong D, Wu C, Zeng X, et al. The role of gut microbiota in the pathogenesis of rheumatic diseases[J]. Clin Rheumatol, 2017, 37 (1): 25-34.
- [10] Chen Y, Wang Y, Xu L, et al. Influence of total glucosides of paeony on PD-1/PD-L1 expression in primary Sjögren's syndrome[J]. Int J Rheum Dis, 2018, 22 (2): 200-206.
- [11] Liu X, Li X, Li X, et al. The efficacy and safety of total glucosides of peony in the treatment of primary Sjögren's syndrome: a multi-center, randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial[J]. Clin Rheumatol, 2018, 38 (2): 657-664.
- [12] Yao P, Cui M, Li Y, et al. Effects of rhubarb on intestinal flora and toll-like receptors of intestinal mucosa in rats with severe acute pancreatitis[J]. Pancreas, 2015, 44 (5): 799-804.
- [13] Müllauer L. Next generation sequencing: clinical applications in solid tumours[J]. Memo, 2017, 10 (4): 244-247.
- [14] Van der Meulen TA, Harmsen H, Bootsma H, et al. The microbiome-systemic diseases connection[J]. Oral Dis, 2016, 22 (8): 719-734.
- [15] De Paiva CS, Jones DB, Stern ME, et al. Altered mucosal microbiome diversity and disease severity in Sjögren syndrome[J]. Sci Rep, 2016, 6 (23561): 1-12.
- [16] Porras D, Nistal E, Martínez-Flórez S, et al. Protective effect of quercetin on high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice is mediated by modulating intestinal microbiota imbalance and related gut-liver axis activation[J]. Free Radic Biol Med, 2016, 102: 188-202.
- [17] Zhang X, Zhang D, Jia H, et al. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment[J]. Nat Med, 2015, 21 (8): 895-905.
- [18] Gulhane M, Murray L, Lourie R, et al. High fat diets induce colonic epithelial cell stress and inflammation that is reversed by IL-22[J]. Sci Rep, 2016, 6: 28990.
- [19] 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 (9): e74963.
- [20] Shi LL, Li Y, Wang Y, et al. MDG-1, an *Ophiopogon* polysaccharide, regulate gut microbiota in high-fat diet-induced obese C57BL/6 mice[J]. Int J Biol Macromol, 2015, 81: 576-583.
- [21] Raloff J. Body & brain: triggering autoimmune assaults: mouth bacteria unleash inflammation-inducing protein[J]. Sci News, 2008, 173 (16): 10.
- [22] 王琳, 高辰哲, 崔石阳, 等. 五味子多糖的酶解辅助提取及其对小鼠肠道菌群的影响 [J]. 食品研究与开发, 2018, 39 (20): 190-196.
- [23] 吴国琳, 余国友, 卢雯雯. 中药复方对肠道微生态的调节作用研究现状 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40 (18): 3534-3537.
- [24] Wu GL, Lu HF, Chen YL, et al. Changes of intestinal microecology in patients with primary Sjögren's syndrome after therapy of Yangyin Yiqi Huoxue Recipe[J]. Chin J Integr Med, 2019, 25 (9): 654-662.
- (收稿: 2020-03-16 在线: 2021-06-03)
责任编辑: 汤 静