

# 芍药汤对湿热泄泻大鼠肠道微生态的影响<sup>△</sup>

凌霄\*,张丽,张佳楠,李春晓,李学林(河南中医药大学第一附属医院药学部/河南省中药临床应用、评价与转化工程研究中心/河南省中药临床药学中医药重点实验室,郑州 450014)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)24-3048-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.24.06



**摘要** 目的 探讨芍药汤对湿热泄泻大鼠肠道微生态的影响。方法 将雄性SD大鼠随机分为生理组、模型组和芍药汤低、中、高剂量组(单次以生药量计分别为5.62、28.10、56.20 g/kg),每组7只。除生理组外,其余组均采用高糖高脂饲料、高温高湿环境饲养联合白酒、大肠杆菌悬液灌胃的方法构建湿热泄泻大鼠模型。造模成功后第2天,芍药汤各剂量组大鼠分别灌胃相应药液,早晚各1次,连续3 d。末次给药后,进行粪便宏基因组测序及生物学信息分析,并检测其肠道细胞色素P450(CYP)酶及肠道菌群代谢酶活性。结果 各组大鼠肠道菌群的各项 $\alpha$ 多样性指标比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。各组大鼠肠道菌群组成相似,主要菌门包括厚壁菌门、放线菌门、疣微菌门等,核心优势菌属包括杜氏杆菌属、乳杆菌属、龙包茨氏菌属;低、中、高剂量芍药汤可不同程度逆转模型组大鼠肠道厚壁菌门、龙包茨氏菌属、双歧杆菌属、单球杆菌属等相对丰度的降低,以及变形菌门、疣微菌门、埃希菌属-志贺菌属、棒状杆菌属等相对丰度的升高( $P<0.05$ )。芍药汤各剂量组大鼠参与碳代谢、辅因子生物合成等途径的肠道菌群的相对丰度较高。与模型组比较,芍药汤各剂量组大鼠的氯苯酚、咪达唑仑代谢消除率,对硝基苯酚浓度(低剂量组除外)及其代谢率均显著升高( $P<0.05$ )。结论 芍药汤可纠正湿热泄泻大鼠的肠道菌群紊乱,促进肠道CYP代谢酶和菌群代谢酶活性的恢复,从而改善肠道微生态。

**关键词** 芍药汤;湿热泄泻;肠道菌群;细胞色素P450酶;肠道代谢酶;宏基因组学

## Effects of Shaoyao decoction on intestinal microecology in rats with damp-heat diarrhea

LING Xiao, ZHANG Li, ZHANG Jianan, LI Chunxiao, LI Xuelin (Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine/Henan Province Engineering Research Center for Clinical Application, Evaluation and Transformation of Traditional Chinese Medicine/Henan Province Key Laboratory for Clinical Pharmacy of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450014, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To explore the impact of Shaoyao decoction on the intestinal microecology of rats with damp-heat diarrhea. **METHODS** Male SD rats were randomly divided into physiological group, model group, and Shaoyao decoction low-, medium- and high-dose groups (single dose of 5.62, 28.10 and 56.20 g/kg, by raw drugs), with 7 rats in each group. Except for the physiological group, the remaining groups were all fed with high-sugar and high-fat diet, raised in a high-temperature and high-humidity environment, and administered white liquor and *Escherichia coli* suspension by gavage to establish a rat model of damp-heat diarrhea. On the second day after modeling, rats in each dosage group of Shaoyao decoction were administered the corresponding solution by gavage, once in the morning and once in the evening, for 3 consecutive days. After the last administration, fecal metagenomic sequencing analysis and biological information analysis were performed to detect the activities of intestinal cytochrome P450 (CYP) enzymes and intestinal flora metabolic enzymes. **RESULTS** There was no significant difference in the  $\alpha$  diversity indexes of intestinal flora among the groups ( $P>0.05$ ). The main phyla of rats in each group included Firmicutes, Actinobacteriota and Verrucomicrobiota, and the core dominant genera included *Dubosiella*, *Lactobacillus* and *Romboutsia*; low-, medium- and high-dose of Shaoyao decoction could reverse the decrease in the relative abundance of Firmicutes, *Romboutsia*, *Bifidobacterium* and *Monoglobus*, as well as the increase in the relative abundance of Proteobacteria, Verrucomicrobiota, *Escherichia-Shigella* and *Corynebacterium* ( $P<0.05$ ). Rats in each dosage group of Shaoyao decoction showed higher relative abundance of intestinal flora involved in carbon metabolism and cofactor biosynthesis pathways. Compared with the model group, the elimination rates of aminophenol and midazolam, as well as the concentration (except for the low-dose group) and metabolic rate of *p*-nitrophenol in rats of each dose group of Shaoyao decoction were significantly increased ( $P<0.05$ ). **CONCLUSIONS** Shaoyao decoction can correct intestinal flora disorder in rats with damp-heat diarrhea, promote the recovery of intestinal CYP metabolic enzymes and intestinal flora metabolic enzymes, and thereby comprehensively improve intestinal microecology.

△ 基金项目 国家自然科学基金青年科学基金项目(No. 82104726);河南省软科学研究项目(No.252400410455)

\*第一作者 副主任药师,博士。研究方向:中药体内过程和药理作用。E-mail:tanglima@126.com

**KEYWORDS** Shaoyao decoction; damp-heat diarrhea; intestinal flora; CYP enzymes; intestinal flora metabolic enzymes; metagenomics

芍药汤首载于《素问病机气宜保命集》，由白芍、黄连、当归、木香、槟榔、炙甘草、大黄、黄芩、肉桂组方而成<sup>[1]</sup>。该方为反治法代表方，是治疗湿热泄泻的主方，临床疗效显著<sup>[2-3]</sup>，但其药效发挥的具体科学内涵尚有待借助现代技术予以阐释，以便后续传承应用。本课题组前期通过16S rDNA序列分析证实，芍药汤可改善湿热泄泻大鼠的肠道菌群多样性<sup>[4]</sup>，但并未对粪便样品进行宏基因组测序分析；且16S rDNA仅能基于保守区进行以属水平为主的分类分析，无法获取具体功能信息，难以满足肠道菌群与宿主健康关联深度机制的研究需求。与16S rDNA序列分析相比，宏基因组测序能直接解析菌群全部遗传信息，实现精准到种甚至菌株水平的物种鉴定，并可同时挖掘功能基因（如代谢通路、耐药基因等），能更全面、精准、系统地解析样本中微生物群落的组成特征及其基因功能。基于此，本研究以湿热泄泻大鼠为对象，探讨芍药汤对大鼠肠道菌群宏基因组学、肠道细胞色素P450（cytochrome P450, CYP450）代谢酶及菌群代谢酶活性的影响，以期为芍药汤作用机制阐释及中医特色治法研究提供新的思路。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用仪器包括 Illumina NovaSeq<sup>TM</sup> X Plus 测序仪（美国 Illumina 公司），GeneAmp 9700 型聚合酶链式反应（PCR）仪（美国 ABI 公司），SPX-150B-8 型生化培养箱（上海博迅实业有限公司医疗设备厂），Vanquish Horizon 型超高效液相色谱系统、Q-Exactive HF-X 型质谱仪、TSQ Quantiva/Endura 型质谱仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司），TU-1901 型紫外-可见分光光度计（北京普析通用仪器有限责任公司）等。

### 1.2 主要药品与试剂

白芍、黄连、当归、木香、槟榔、炙甘草、大黄、黄芩、肉桂饮片（批号分别为 20200201、200301、200603、191201、190501CP0655、200508、02-19120201、20200203、20191211）均购自河南张仲景大药房股份有限公司，由河南中医药大学第一附属医院药检室施钧瀚副主任药师鉴定均为真品。

对照品氨苯砜（批号 100114-201602，纯度 99.2%）、咪达唑仑（批号 171265-201402，纯度 99.8%）、黄芩苷（内标，批号 110715-202223，纯度 97.2%）均购自中国食品药品检定研究院；LB 肉汤培养基（批号 L8291）购自北京索莱宝科技有限公司；DNA 提取试剂盒（批号 dp712-02）购自天根生化科技（北京）有限公司；AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒（批号 AP-GX-250）购自美国 Axygen Scientific 公司；NEXTFlex<sup>TM</sup> Rapid DNA-Seq 试剂盒（批号 5114-08）购自美国 BIOO 公司；NovaSeq X Series 25B 测序试剂盒（批号 20104706）购自美国 Illumina 公司；对硝基苯基-β-D-吡喃葡萄糖苷（批号 P134941）购自阿拉丁试剂（上海）有限公司；甲醇、乙腈、乙酸均为色谱纯，其余试剂均为分析纯或实验室常用规格，水为纯净水。

### 1.3 动物与饲料

本研究使用的健康清洁级雄性 SD 大鼠由河南省实验动物中心提供，体重为 160~200 g，动物生产许可证号为 SCXK(豫)2017-0001。所有实验动物均日常饲养于清洁级动物实验室（温度 20~26 °C，相对湿度 40%~70%）内，自由摄食、饮水。高糖高脂饲料、普通饲料均由河南省实验动物中心提供。本实验全程遵循实验动物福利伦理相关要求，研究方案获得河南中医药大学第一附属医院实验动物福利伦理审查委员会审批（批准编号 YFYDW2020010）。

### 1.4 细菌

大肠埃希菌 *Escherichia coli* 标准菌株 CVCC1524，由中国兽医药品监察所提供。

## 2 方法

### 2.1 药液的制备

取白芍 30 g，黄连、当归、黄芩各 15 g，木香、槟榔、炙甘草各 6 g，大黄 9 g，肉桂 5 g，混合；加 6 倍量水浸泡 30 min 后，煎煮 40 min，过滤；药渣以同法再次煎煮，过滤；合并两次滤液，冷冻干燥，备用。临用前，以生理盐水稀释，制成 0.2 g/mL（以生药量计，下同）的药液，作为低剂量组药液；按比例增加各饮片用量，同法煎煮、干燥、稀释，分别制成 1.2 g/mL 的药液，作为中、高剂量组药液。

### 2.2 造模与分组

将大鼠随机分为生理组、模型组、芍药汤高剂量组、芍药汤中剂量组、芍药汤低剂量组，每组 7 只。生理组大鼠以普通饲料于常规环境下饲养，其余 4 组大鼠参考文献方法<sup>[5]</sup>建立湿热泄泻模型：大鼠先以含 12% 猪油和 8% 蜂蜜的高糖高脂饲料饲养 7 d，再于高温高湿环境[温度 (32±2) °C、相对湿度 85%~90%]下饲养 7 d。于造模的最后 3 d，灌胃 52 度白酒（每 200 g 体重灌胃 2 mL），每天 1 次，连续 3 d；于造模的最后 2 d，灌胃 1×10<sup>9</sup> cfu/mL 大肠埃希菌菌悬液（以生理盐水为溶剂，每 200 g 体重灌胃 2 mL），每天 1 次。若大鼠出现稀便症状 ≥1 d，则视为模型构建成功。

造模成功后第 2 天，生理组和模型组大鼠灌胃等体积生理盐水（每 200 g 体重灌胃 5.6 mL），芍药汤低、中、高剂量组大鼠分别灌胃“2.1”项下芍药汤药液（每 200 g 体重每次灌胃 5.6 mL，即单次以生药量计分别为 5.62、28.10、56.20 g/kg，相当于 1、5、10 倍临床等效剂量），每天早晚各 1 次，连续 3 d。

### 2.3 粪便宏基因组测序与生物学信息分析

末次给药 3 h 后，采集各组 7 只大鼠的新鲜粪便样品，于 -80 °C 保存。取出上述样品，加入磷酸盐缓冲液（PBS）适量，充分振荡混匀 5~10 min 后，以 3 000×g 离心 5 min×3 次；合并上清液，以 15 000×g 离心 5 min；收集菌体沉淀，依次用 PBS 洗涤 4 次、水洗涤 1 次后，用水 50 μL 重悬，加入等体积 TritonX-100 试剂，于沸水浴中静置 5 min，再于冰浴中骤冷，得细菌裂解液，备用。取上述裂解液，利用相应试剂盒抽提样品总 DNA，待检测。

其浓度、纯度和完整性后进行片段化处理；筛选长度约400 bp的DNA片段，使用NEXTFlex™ Rapid DNA-Seq试剂盒构建双端测序文库，再使用测序仪进行宏基因组测序。上述实验由上海美吉生物医药科技有限公司完成。

采用Fastp软件对所得序列文本(reads)3'、5'端的adapter序列进行质量剪切，去除长度<50 bp、平均碱基质量<20以及含氮碱基的reads；采用BWA 0.7.17软件进行宿主DNA序列比对，去除相似性高的污染reads；使用UPARSE软件，以相似度97%为阈值对测序序列进行操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)聚类分析，并根据OTU聚类结果进行 $\alpha$ 多样性分析、各菌群(门、属水平)组间丰度差异分析；根据相对丰度进行主要菌门和优势菌属分析。使用MEGAHIT 1.1.2软件对优化后的序列进行拼接组装，并筛选长度 $\geq 300$  bp的重叠群(contigs)作为最终的拼接结果；使用Prodigal 2.6.3软件对上述contigs进行开放阅读框(open reading frames, ORFs)预测，选择长度 $\geq 100$  bp的片段，将其翻译为氨基酸序列；采用CD-HIT 4.7软件对预测出的所有样品序列进行聚类分析，以最长的基因序列为代表，构建非冗余基因集；使用Diamond 2.0.13软件将非冗余基因集的氨基酸序列与京都基因和基因组数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)进行比对(BLASTP比对参数设置期望值e-value为 $1 \times 10^{-5}$ )<sup>[6]</sup>，获得各组非冗余基因对应的KEGG功能，并以基因和蛋白功能分类(KEGG orthology annotation，简称“KO注释”)、代谢通路(pathway)、酶学分类(enzyme commission classification, EC)、表达相似基因集合(module)对应的基因丰度总和计算对应功能类别的丰度。上述实验亦由上海美吉生物医药科技有限公司完成。

## 2.4 肠道CYP代谢酶活性检测

### 2.4.1 色谱与质谱条件

以Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub>(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7  $\mu$ m)为色谱柱，以0.1%甲酸溶液(A)-乙腈(B)为流动相进行梯度洗脱(0~5.0 min, 20% B $\rightarrow$ 100% B；5.0~6.0 min, 100% B；6.0~6.1 min, 100% B $\rightarrow$ 20% B；6.1~9.0 min, 20% B)；柱温为30 °C；流速为0.2 mL/min；进样量为1  $\mu$ L。

采用电喷雾电离源，以多反应监测(multiple-reaction monitoring, MRM)模式进行正离子扫描；毛细管电压为3 500 V；雾化器压力为25 psi；干燥气温度为325 °C；干燥气流速为7.0 L/min；碰撞气为高纯氮气。各待测成分及内标的定量用质谱参数见表1。

表1 各待测成分及内标的定量用质谱参数

待测成分/内标	母离子m/z	子离子m/z	驻留时间/ms	碎裂电压/V	碰撞能/eV
氨苯砜	249.1	92.1	200	100	21
咪达唑仑	341.9	323.7	200	30	22
黄芩苷(内标)	447.0	271.0	200	60	21

### 2.4.2 溶液制备与方法学考察

精密称取氨苯砜、咪达唑仑对照品各适量，加甲醇溶解，制成每1 mL含氨苯砜2.5 mg和咪达唑仑2.82 mg的混合对照品母液。精密吸取上述混合对照品母液，以甲醇稀释，制成一系列质量浓度的对照品溶液，备用。取黄芩苷对照品适量，用甲醇溶解，制成每1 mL含黄芩苷10  $\mu$ g的内标工作液，备用。定量分析的方法学考察符合《药物非临床药代动力学研究技术指导原则》<sup>[7]</sup>的相关要求。

### 2.4.3 样品孵育体系建立

末次给药后，将大鼠禁食不禁水24 h；随后，各组取6只大鼠，麻醉后处死，分离其幽门下肠段适量，参考文献方法<sup>[8]</sup>制备大鼠肠微粒体(质量浓度为255 ng/ $\mu$ L)，并构建样品孵育体系。该孵育体系包含500 ng/mL的氨苯砜、1 400 ng/mL咪达唑仑、100 mmol/L PBS(pH7.4)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)生成系统(1.3 mmol/L烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、3.3 mmol/L葡萄糖-6-磷酸、1.08 U/mL葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、3.3 mmol/L氯化镁)和肠微粒体，反应总体积为200  $\mu$ L。

### 2.4.4 样品孵育、处理与代谢率测定

将上述孵育体系于37 °C下孵育20 min，加冰甲醇190  $\mu$ L终止反应，以15 000 $\times g$ 离心5 min；取上清液80  $\mu$ L，精密加入内标工作液20  $\mu$ L，涡旋混匀30 s；加入甲醇500  $\mu$ L，涡旋混匀3 min，再以15 000 $\times g$ 离心10 min；取上清液，以氮气流吹干，残渣用甲醇200  $\mu$ L复溶，涡旋混匀2 min，再以15 000 $\times g$ 离心10 min，取上清液进行超高效液相色谱-串联质谱分析。通过检测反应前后探针药物氨苯砜和咪达唑仑的质量浓度变化，计算探针药物代谢率[探针药物代谢率=(1-孵育后反应体系中探针药物的质量浓度/初始时反应体系中探针药物的质量浓度) $\times 100\%$ ]，用于表征各组大鼠肠微粒体中CYP450代谢酶活性。

### 2.5 肠道菌群代谢酶活性检测

参考文献方法<sup>[9]</sup>，于末次给药3 h后，收集各组6只大鼠的结肠和回肠段内容物，加入4倍量的PBS稀释，制成混悬液；取上述混悬液1 mL加入LB肉汤培养基5 mL，混匀，制得肠菌培养液；精密量取上述肠菌培养液5 mL，以醋酸钠-醋酸缓冲液定容至25 mL，制得酶溶液。取另一离心管，加入醋酸钠-醋酸缓冲液(pH与酶溶液相同)0.6 mL、上述酶溶液0.2 mL、20 mmol/L底物(对硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷)溶液0.2 mL，于37 °C下孵育120 min，随后以1 mol/L碳酸二钠溶液2.5 mL终止反应。反应溶液经离心后取上清液，使用紫外-可见分光光度计于400 nm波长下测定其吸光度值，按标准曲线法计算最终反应体系中对硝基苯酚的含量并计算底物代谢率(底物代谢率=孵育后反应体系中对硝基苯酚的摩尔浓度/初始时反应体系中底物的摩尔浓度 $\times 100\%$ )，用于表征各组大鼠肠道菌群代谢酶活性。

## 2.6 统计学方法

采用SPSS 24.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,进一步两两比较采用LSD-t检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 芍药汤对肠道菌群的影响

#### 3.1.1 $\alpha$ 多样性分析

各组大鼠肠道菌群的 $\alpha$ 多样性指标[包括丰度覆盖度估计量(abundance-based coverage estimator, ACE)和Chao、Shannon、Simpson指数]虽有细微波动,但组间比较的差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。结果见表2。

表2 各组大鼠粪便样品中肠道菌群的 $\alpha$ 多样性指标比较( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

组别	ACE	Chao指数	Shannon指数	Simpson指数
生理组	710.93 $\pm$ 163.03	685.98 $\pm$ 155.65	3.22 $\pm$ 0.64	0.10 $\pm$ 0.01
模型组	434.89 $\pm$ 132.04	429.75 $\pm$ 128.04	2.59 $\pm$ 0.52	0.15 $\pm$ 0.08
芍药汤高剂量组	794.25 $\pm$ 114.05	774.93 $\pm$ 99.56	3.42 $\pm$ 0.41	0.09 $\pm$ 0.03
芍药汤中剂量组	560.85 $\pm$ 118.29	548.07 $\pm$ 116.94	3.23 $\pm$ 0.25	0.10 $\pm$ 0.03
芍药汤低剂量组	680.37 $\pm$ 53.58	662.01 $\pm$ 49.31	3.23 $\pm$ 0.25	0.10 $\pm$ 0.03

#### 3.1.2 肠道菌群组成分析

在门水平(图1A)中,各组大鼠肠道菌群组成相似,主要菌门为厚壁菌门 Firmicutes、放线菌门 Actinobacteriota、疣微菌门 Verrucomicrobiota、变形菌门 Proteobacteria,其相对丰度均超过1%。与生理组相比,模型组厚壁菌门的相对丰度显著降低,变形菌门、疣微菌门的相对丰度均显著升高( $P<0.05$ );与模型组比较,芍药汤低、高剂量组厚壁菌门的相对丰度均显著升高,变形菌门、疣微菌门的相对丰度均显著降低( $P<0.05$ ),且其菌群结构接近于生理组;芍药汤中剂量组变形菌门的相对丰度亦显著降低( $P<0.05$ ),其余菌门的相对丰度与模型组比较的差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。

在属水平(图1B)上,5组大鼠的核心优势菌属(相对丰度 $>5\%$ )呈高度保守性,其中杜氏杆菌属 *Dubosibacteria*、乳杆菌属 *Lactobacillus* 和龙包茨氏菌属 *Romboutsia* 的相对丰度均排前3位。进一步分析结果显示,与生理组相比,模型组埃希菌属-志贺菌属 *Escherichia-Shigella* (典型致病菌)、阿克曼氏菌属 *Akkermansia*、乳杆菌属、

棒状杆菌属 *Corynebacterium* 的相对丰度均显著升高( $P<0.05$ ),龙包茨氏菌属、严格梭菌群 *Clostridium\_sensu\_stricto\_1*、双歧杆菌属 *Bifidobacterium*、苏黎世杆菌属 *Turicibacter*、丹毒丝菌科未分类群 *norank\_f\_Erysipelotrichaceae*、瘤胃球菌科未分类群 *norank\_f\_Ruminococcaceae*、别样杆菌属 *Allobaculum*、单球杆菌属 *Mongobius*、NK4A214群 NK4A214\_group 的相对丰度均显著降低( $P<0.05$ )。与模型组比较,芍药汤各剂量组龙包茨氏菌属、严格梭菌群、双歧杆菌属、苏黎世杆菌属、单球杆菌属的相对丰度,芍药汤低、高剂量组的瘤胃球菌科未分类群、别样杆菌属、NK4A214群的相对丰度以及芍药汤中、低剂量组的丹毒丝菌科未分类群的相对丰度均显著升高( $P<0.05$ );芍药汤各剂量组乳杆菌属、埃希菌属-志贺菌属的相对丰度,芍药汤高剂量组棒状杆菌属的相对丰度以及芍药汤高、低剂量组阿克曼氏菌属的相对丰度均显著降低( $P<0.05$ )。

#### 3.1.3 KEGG通路富集分析

注释到KEGG数据库的基因共3 502个,各组独占和共有基因的分布情况见图2。

各组间具有明显差异的通路共381条( $P<0.05$ ),其中基因功能关联菌群相对丰度排前15位的通路如图3所示。其中,与生理组相比,模型组氨基酸生物合成、淀粉和蔗糖代谢相关菌群的相对丰度均显著降低( $P<0.05$ )。与模型组相比,芍药汤高剂量组相对丰度较高的肠道菌群对应基因主要富集于代谢通路、辅因子生物合成( $P<0.05$ ),相对丰度较低的肠道菌群对应基因主要富集于氨基酸生物合成、碳代谢、氨酰基-tRNA生物合成、淀粉和蔗糖代谢、同源重组、肽聚糖合成、错配修复、DNA复制( $P<0.05$ );芍药汤中剂量组相对丰度较高的肠道菌群对应基因主要富集于代谢通路、辅因子生物合成、淀粉和蔗糖代谢、半乳糖代谢( $P<0.05$ ),相对丰度较低的肠道菌群对应基因主要富集于核苷酸代谢、嘧啶代谢、同源重组、肽聚糖合成、错配修复、DNA复制( $P<0.05$ );芍药汤低剂量组相对丰度较高的肠道菌群对应基因主要富集于碳代谢( $P<0.05$ )。

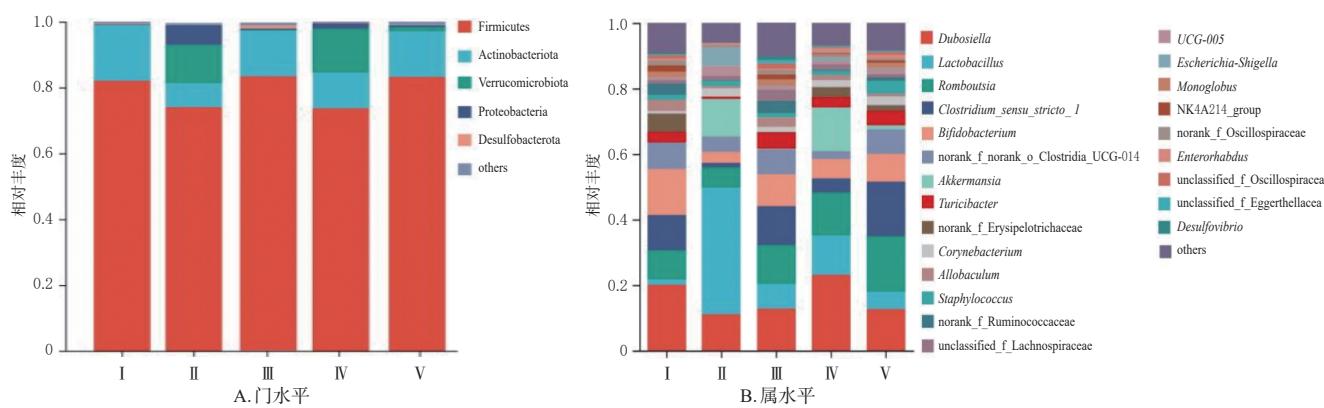


图1 各组大鼠粪便样品中肠道菌群的结构比较

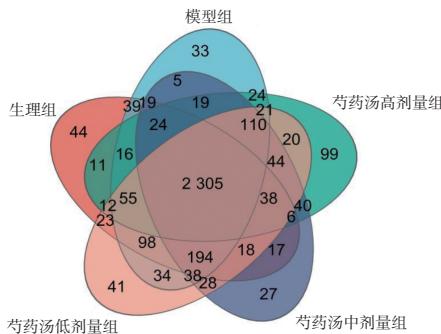


图2 各组大鼠肠道菌群KEGG富集基因分布的Venn图

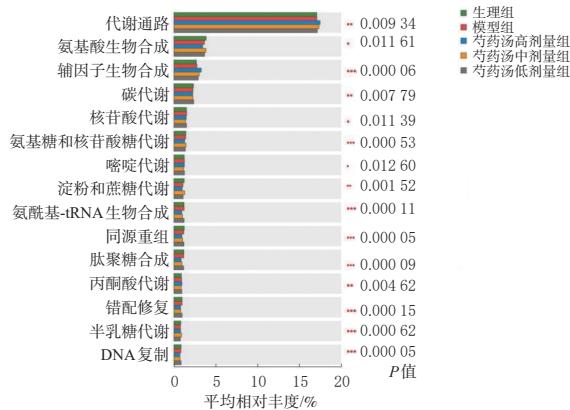


图3 各组大鼠肠道菌群对应基因富集的差异通路(相对丰度排前15位)

### 3.2 莪药汤对肠道CYP代谢酶的影响

与生理组比较,模型组大鼠氨苯砜、咪达唑仑的代谢消除率均显著降低( $P<0.05$ );与模型组比较,芍药汤各剂量组大鼠氨苯砜、咪达唑仑的代谢消除率均显著升高( $P<0.05$ )。结果见表3。

表3 各组大鼠肠微粒体中氨苯砜和咪达唑仑代谢消除率比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	氨苯砜代谢消除率/%	咪达唑仑代谢消除率/%
生理组	61.59±6.90	64.19±4.12
模型组	17.74±7.13 <sup>a</sup>	20.89±7.44 <sup>a</sup>
芍药汤高剂量组	41.78±17.07 <sup>b</sup>	54.23±7.22 <sup>b</sup>
芍药汤中剂量组	24.83±5.90 <sup>b</sup>	34.64±10.52 <sup>b</sup>
芍药汤低剂量组	38.79±12.25 <sup>b</sup>	44.67±7.06 <sup>b</sup>

a:与生理组比较,  $P<0.05$ ; b:与模型组比较,  $P<0.05$ 。

### 3.3 莪药汤对肠道菌群代谢酶活性的影响

与生理组比较,模型组大鼠的对硝基苯酚浓度及其代谢率均显著降低( $P<0.05$ );与模型组比较,芍药汤中、高剂量大鼠的对硝基苯酚浓度和芍药苷各剂量组大鼠的对硝基苯酚代谢率均显著升高( $P<0.05$ )。结果见表4。

## 4 讨论

芍药汤是治疗湿热泄泻的主方,临床疗效显著。本课题组前期研究发现,芍药汤可改善湿热泄泻大鼠的肠道菌群多样性。为进一步明确该方对湿热泄泻大鼠肠道微生态的影响,本研究进一步开展了肠道菌群宏基因组学及生物信息学分析,并对肠道CYP代谢酶活性及肠道菌群代谢酶活性进行了评价。

表4 各组大鼠体内对硝基苯酚浓度及其代谢率比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	对硝基苯酚浓度/(mmol/L)	对硝基苯酚代谢率/%
生理组	14.615±0.544	74.04±1.90
模型组	11.282±0.625 <sup>a</sup>	56.12±3.53 <sup>a</sup>
芍药汤高剂量组	13.319±0.442 <sup>b</sup>	66.56±2.55 <sup>b</sup>
芍药汤中剂量组	12.513±0.475 <sup>b</sup>	61.65±1.37 <sup>b</sup>
芍药汤低剂量组	11.655±0.238	58.27±1.29 <sup>b</sup>

a:与生理组比较,  $P<0.05$ ; b:与模型组比较,  $P<0.05$ 。

在肠道菌群差异方面,模型组大鼠体内龙包茨氏菌属、苏黎世杆菌属、双歧杆菌属、别样杆菌属、严格梭菌群、单球杆菌属、瘤胃球菌科未分类群、NK4A214群、丹毒丝菌科未分类群的相对丰度均较生理组显著降低,而低、中、高剂量的芍药汤可不同程度地提高上述菌属的相对丰度。研究指出,龙包茨氏菌属能产生大量丁酸,有助于减轻肠道炎症反应<sup>[10]</sup>;双歧杆菌为益生菌,可促进多种肠道疾病的转归<sup>[11]</sup>;苏黎世杆菌属的相对丰度与免疫反应呈正相关<sup>[12]</sup>;严格梭菌群在多种疾病的治疗过程中均有明显上调,对疾病转归具有积极作用<sup>[13]</sup>;别样杆菌属对肠道屏障完整性的维持和肠道免疫系统的构建至关重要,是肠道内的保护性菌群<sup>[14]</sup>;单球杆菌属在健康人群肠道内显著富集,与抗炎、增强肠道屏障、缓解结肠炎有关<sup>[15]</sup>;瘤胃球菌科未分类群和NK4A214群通常在健康人群体内富集,可参与短链脂肪酸合成<sup>[16-17]</sup>;丹毒丝菌科未分类群则具备合成脂肪酸的能力<sup>[16-17]</sup>。同时,模型组大鼠两类致病菌属(埃希菌属-志贺菌属、棒状杆菌属)的相对丰度均较生理组显著上升,而低、中、高剂量的芍药汤可不同程度地降低上述菌属的相对丰度。文献指出,埃希菌属-志贺菌属是肠道细菌感染性疾病的主要致病菌<sup>[18]</sup>;白喉棒杆菌、纹带棒杆菌等棒状杆菌属细菌均为典型致病菌<sup>[19]</sup>。上述肠道菌群分析结果表明,芍药汤可显著改善湿热泄泻大鼠的肠道菌群结构,主要表现为上调益生菌属或潜在益生菌、下调致病菌。

在差异代谢通路方面,与健康大鼠相比,在湿热泄泻状态下,大鼠体内参与氨基酸生物合成、淀粉和蔗糖代谢的肠道菌群的相对丰度较低。研究指出,氨基糖代谢异常会导致肠道炎症和渗透性增加,从而引发腹泻<sup>[20]</sup>;淀粉和蔗糖是人体必需的碳水化合物,在提供能量的同时还可产生短链脂肪酸,后者有助于维护肠道屏障,其代谢紊乱会削弱肠道屏障功能进而诱发腹泻<sup>[21-22]</sup>。中剂量的芍药汤可显著提升富集于淀粉和蔗糖代谢通路相关基因所对应肠道菌群的相对丰度,从而改善湿热泄泻对上述通路造成的不良影响。此外,本研究结果还显示,低、中、高剂量芍药汤在其余通路方面的表现亦与模型组存在明显差异,主要涉及碳代谢、核苷酸代谢、肽聚糖合成、嘧啶代谢和氨酰基-tRNA生物合成等。碳代谢紊乱,可减少短链脂肪酸生成,从而削弱肠道屏障功能,最终诱发腹泻<sup>[21-22]</sup>;核苷酸代谢可促进益生菌增殖,增强肠道黏膜屏障功能<sup>[20]</sup>;肽聚糖合成异

常可破坏肠道菌群平衡,削弱黏膜屏障功能,进而诱发腹泻<sup>[23]</sup>;嘧啶代谢涉及DNA/RNA合成、能量供应,其代谢异常可诱导肠道细胞凋亡,破坏肠道屏障功能<sup>[24]</sup>;氨酰基-tRNA生物合成是蛋白翻译的核心环节,其生物合成异常会破坏黏膜蛋白合成并激活免疫炎症反应,从而诱发或加重腹泻<sup>[25]</sup>。芍药汤对上述代谢途径的调控,体现了其改善湿热泄泻大鼠肠道微生态的复杂作用机制。

本研究结果还显示,湿热泄泻大鼠体内氨苯砜、咪达唑仑的代谢消除率和对硝基苯酚浓度及其代谢率均较正常大鼠显著降低,提示湿热泄泻大鼠肠道CYP酶和肠道菌群代谢酶活性均明显减弱。经不同剂量芍药汤干预后,大鼠体内氨苯砜、咪达唑仑的代谢消除率和对硝基苯酚浓度(低剂量组除外)及其代谢率均显著升高,提示芍药汤可有效促进肠道CYP代谢酶和肠道菌群代谢酶活性向正常生理状态转归。

综上所述,芍药汤可纠正湿热泄泻大鼠的肠道菌群紊乱,可促进肠道CYP代谢酶和菌群代谢酶活性的恢复,从而改善肠道微生态,但该方对肠道菌群的具体调控机制尚有待进一步深入探讨。

## 参考文献

[1] 邓中甲.方剂学[M].北京:中国中医药出版社,2005:96.

[2] 董洪飞.通因通用法探寻及代表方芍药汤配伍特点分析[J].中医研究,2016,29(5):51-53.

[3] 罗兰,史一帆,邓露珠,等.经典名方芍药汤的古代文献考证与分析[J].河南中医,2025,45(6):852-865.

[4] 凌霄,李伟霞,李春晓,等.芍药汤对湿热泄泻大鼠的炎性细胞因子与肠道菌群的影响[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(5):16-24.

[5] 王涛.两种不同方法建立大鼠湿热泄泻模型的比较研究[D].兰州:甘肃农业大学,2016:10-12.

[6] BUCHFINK B, XIE C, HUSON D H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND[J]. Nat Methods, 2015, 12(1):59-60.

[7] 唐晓闻,吕鹏,董田甜,等.《药物非临床药代动力学研究技术指导原则》与ICH S3B指导原则的对比研究及实施建议[J].现代药物与临床,2018,33(8):2142-2144.

[8] 任秀华,斯陆勤,曹磊,等.以咪唑啉为探针药测定大鼠肠CYP3A活性及其孵育条件优化[J].中国药学杂志,2010,45(9):654-658.

[9] 王振强,王振伟,张耀光.β-葡萄糖醛酸酶提取及其活性研究[J].食品研究与开发,2011,32(7):148-151.

[10] HIIPPALA K, BARRETO G, BURRELLO C, et al. Novel *Odoribacter splanchnicus* strain and its outer membrane vesicles exert immunoregulatory effects *in vitro*[J]. Front Microbiol, 2020, 11:575455.

[11] XIAO Y, ZHAO J X, ZHANG H, et al. Mining *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* for organisms with long-term gut colonization potential[J]. Clin Nutr, 2020, 39 (5) : 1315-1323.

[12] LYNCH J B, GONZALEZ E L, CHOY K, et al. Gut mi-crobiota *Turicibacter* strains differentially modify bile acids and host lipids[J]. Nat Commun, 2023, 14(1):3669.

[13] MA L Y, SHEN Q C, LYU W T, et al. *Clostridium butyricum* and its derived extracellular vesicles modulate gut homeostasis and ameliorate acute experimental colitis[J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(4):e0136822.

[14] VAN MUIJWIJK G H, VAN MIERLO G, JANSEN P W T C, et al. Identification of *Allobaculum mucolyticum* as a novel human intestinal mucin degrader[J]. Gut Microbes, 2021, 13(1):1966278.

[15] KIM C C, LUNKEN G R, KELLY W J, et al. Genomic insights from *monoglobus pectinolyticus*: a pectin-degrading specialist bacterium in the human colon[J]. ISME J, 2019, 13(6):1437-1456.

[16] GU X Q, SIM J X Y, LEE W L, et al. Gut Ruminococca-ceae levels at baseline correlate with risk of antibiotic-associated diarrhea[J]. iScience, 2021, 25(1):103644.

[17] CHEN Z L, RADJABZADEH D, CHEN L M, et al. Association of insulin resistance and type 2 diabetes with gut microbial diversity: a microbiome-wide analysis from population studies[J]. JAMA Netw Open, 2021, 4 (7) : e2118811.

[18] ZHANG Z X, TAYLOR L, SHOMMU N, et al. A diversified dietary pattern is associated with a balanced gut microbial composition of *Faecalibacterium* and *Escherichia/ Shigella* in patients with Crohn's disease in remission[J]. J Crohns Colitis, 2020, 14(11):1547-1557.

[19] HACKER E, ANTUNES C A, MATTOS-GUARALDI A L, et al. *Corynebacterium ulcerans*, an emerging human pathogen[J]. Future Microbiol, 2016, 11:1191-1208.

[20] SHEN W, DE BOER J F, KUIPERS F, et al. New insights in amino sugar metabolism by the gut microbiome[J]. Gut Microbes. 2025, 17(1):2510462.

[21] HAMMER H F, HAMMER J. Diarrhea caused by carbohydrate malabsorption[J]. Gastroenterol Clin North Am, 2012, 41(3):611-627.

[22] SINGH P, NEE J. Role of diet in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome[J]. J Clin Gastroenterol, 2021, 55 (1):25-29.

[23] FENG B S, HE S H, ZHENG P Y, et al. Mast cells play a crucial role in *Staphylococcus aureus* peptidoglycan-induced diarrhea[J]. Am J Pathol, 2007, 171(2):537-547.

[24] XIONG Y H, WU L, SHAO L, et al. Dynamic alterations of the gut microbial pyrimidine and purine metabolism in the development of liver cirrhosis[J]. Front Mol Biosci, 2022, 8:811399.

[25] WUSIMAN W, ZHANG Z R, DING Q, et al. The pathophysiological role of aminoacyl-tRNA synthetases in digestive system diseases[J]. Front Physiol, 2022, 13: 935576.

(收稿日期:2025-06-11 修回日期:2025-11-03)

(编辑:张元媛)