

基于 PCR-DGGE 研究人参乌梅汤加味对腹泻模型大鼠肠道菌群构成特征的影响

赵琼¹, 孙群², 黄勤挽³, 聂远洋², 赵兴¹, 任士庞¹, 张玉¹, 黄晶晶¹

(1. 成都中医药大学临床医学院/附属医院, 成都, 610075;

2. 四川大学生命科学学院, 成都, 610064;

3. 成都中医药大学药学院, 成都, 610075)

摘要:目的: 采用多聚酶链反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术研究中药复方人参乌梅汤加味对腹泻模型大鼠肠道菌群构成特征的影响。方法: 48 只 SD 大鼠随机抽取 12 只为空白组, 其余 36 只参照文献方法以复合因素制作腹泻模型。造模成功后随机分为模型组、西药组、中药组, 每组 12 只。造模 21d 开始给药干预, 空白组和模型组予生理盐水, 其余各组分别给予妈咪爱、人参乌梅汤加味, 均 1 次/d, 连续给药 7d。收集各组大鼠粪便排泄物, 提取粪便细菌总基因组 DNA, PCR 扩增细菌 16SrDNA 基因 V3 可变区, DGGE 方法检测 PCR 产物。对优势条带进行回收测序, 鉴定菌种。结果: 药物处理后腹泻模型大鼠肠道微生物相对丰度最高的为厚壁菌门类细菌, 其次为拟杆菌门和变形菌门类细菌。人参乌梅汤加味治疗后大鼠肠道厚壁菌门类细菌含量显著增加 ($P<0.01$), 而肠道拟杆菌门类细菌含量显著降低 ($P<0.01$), 肠道变形菌门类细菌含量无显著变化 ($P>0.05$)。与空白组相比, 经人参乌梅汤加味治疗后大鼠菌群较之西药组更接近空白组。结论: 人参乌梅汤加味较之西药对肠道菌群平衡更具有良性的调控作用, 可能通过影响肠道菌群结构, 纠正菌群紊乱, 进而发挥生津止泻效应。

关键词: 多聚酶链反应-变性梯度凝胶电泳; 人参乌梅汤加味; 腹泻; 肠道菌群; 16SrDNA
中图分类号: 请查阅《中国图书馆分类法》

Study the impact based on PCR-DGGE ginseng wumei decoction of diarrhea in rats constituent features of intestinal flora

ZhaoQiong¹, SunQun², Qin-Wan Huang³, Yuan-Yang Nie², Zhao Xing¹, Shi-Pang Ren¹, Zhang Yu¹, Jing-Jing Huang¹

(1. College of Clinical Medical, Chengdu University of TCM/ Affiliated Hospital, Chengdu 610075;

2. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064;

3. College of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 610075)

Abstract: Objective: It is to study the influence of compound ginseng wumei decoction on the Characteristics of the diarrhea model rats intestinal flora by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis technology. Methods: Randomly selected 12 from 48 SD rats for the control group, and the remaining 36 according to the literature method were made into diarrhea model by combined factors. After the success of the building were randomly divided into model group, western medicine, Chinese medicine group, each group of 12. Building 21d to drug intervention, the control group and model group to saline, the rest group were given mammy love, ginseng wumei decoction, the average of 1 / d, continuous administration 7d. Collect all rats feces in each group, extract fecal bacteria genomic DNA, PCR amplified bacteria 16S rDNA gene V3 variable region. DGGE method for detecting PCR products. Advantages bands were recovered for sequencing and identification of bacteria species. Results: drug treatment of diarrhea model rats after the highest relative abundance of intestinal microbial was Firmicutes bacteria categories,

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81102544); 教育部博士点基金项目 (20115132120013)

作者简介: 赵琼 (1972 年—), 女, 研究员, 主要研究方向: 小儿脾胃病证防治研究

通信联系人: 孙群 (1967—), 女, 教授, 主要研究方向: 微生物技术. E-mail: qunsun@scu.edu.cn

followed by Bacteroidetes and Proteobacteria categories. Ginseng wumei decoction in rats after treatment intestinal Firmicutes bacteria content increased significantly ($P < 0.01$), while the intestinal bacteroidetes bacteria content decreased significantly ($P < 0.01$), Proteobacteria categories showed no significant change ($P > 0.05$). Compared with the western medicine group, after ginseng wumei decoction rat microbiota much closer to the control group. Conclusion: Compared with western medicine Ginseng wumei decoction can take beneficial action on the intestinal flora balance. Ginseng wumei decoction may influence the structure of the intestinal flora to correct flora disturbance, and then develop fluid antidiarrheal effect..

Key words: PCR-DGGE, Ginseng wumei decoction, diarrhea, intestinal flora, 16SrDNA

0 引言

小儿腹泻病的治疗过多应用静脉输液及滥用抗生素不利于患儿肠道内环境稳态的恢复, 中医药辨证治疗小儿腹泻病疗效确切, 无论内治或外用, 还是联合治疗都彰显其独特优势。人参乌梅汤(《温病条辨》)系用于治疗久痢伤及脾胃阴液“口渴舌干”之证, 是临床治小儿腹泻气阴两虚证的代表方剂。以人参乌梅汤加味治疗气阴两虚型小儿腹泻病, 经临床验证和动物实验表明, 该方具有较好的生津止泻疗效。本研究结合中医理论和现代研究成果, 采用多聚酶链反应-变性梯度凝胶电泳(polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE)技术研究人参乌梅汤加味对腹泻模型大鼠肠道微生态的影响, 以进一步揭示人参乌梅汤加味酸甘化阴生津止泻效应的作用机制。

1 材料

1.1 动物

SD 幼龄大鼠 48 只, SPF 级, 体重 70 ± 10 g, 雌雄各半。成都达硕生物科技有限公司提供, SCXK(川)2014-028。

1.2 药物

人参乌梅汤加味(生晒参 8g, 乌梅 8g, 山楂 5g, 山药 5g, 石榴皮 5g, 广藿香 5g, 茯苓 5g, 莲子 5g, 炮姜 1g, 炙甘草 3g) 1.16g 生药/mL、35%番泻叶液, 均由成都中医药大学药剂教研室制备提供和鉴定, 4℃冰箱保温备用。妈咪爱(北京韩美药品有限公司, 批号 S20020037)。

1.3 试剂和仪器

Stool DNA Kit (美国 OMEGA 公司), Gel Extraction Kit (美国 OMEGA 公司), 16S rDNA 及 V3 区引物(英潍捷基(上海)贸易有限公司合成), Premix Taq®Version2.0 (Loading dye mix) (日本 Takara 公司)。S1000™ PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司), Bio-Rad Universal Hood II 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司), DCode™ Universal Mutation Detection System (美国 Bio-Rad 公司); 高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司), BD1110 型微量核酸蛋白定量仪(英国 BioDrop 公司)。

2 方法

2.1 动物分组和造模

大鼠随机抽取 12 只为空白组(A 组), 其余 36 只参照文献方法^{[1][2]}, 采用苦寒中药泻下、游泳力竭复合作腹泻模型。造模成功后, 随机分为模型组(B 组)、西药组(D 组)、中药组(E 组), 每组 12 只。造模 21d 开始给药干预。空白组和模型组予生理盐水 $ig(30\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1})$, 西药组给予妈咪爱 $ig(0.7\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$ 、中药组给予加味人参乌梅汤 $ig(35\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$, 均 1 次/d, 连续给药 7d。处死大鼠, 剪取结肠约 1cm, 将结肠内容物取出转移至冻存管放入液氮中保存备用。

2.2 提取粪便总基因组 DNA

90 采用 Stool DNA Kit 试剂盒按改进的快速离心法提取大鼠肠道内容物基因组总 DNA, 分别用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳和超微量分光光度计检测提取结果。

2.3 PCR 扩增

采用巢式 PCR, 第一轮 PCR 以基因组 DNA 为模板扩增 16S rDNA 全序列, 琼脂糖凝胶电泳回收之后以 16S rDNA 为模板扩增 16S rDNA V3 区。第一轮 PCR 引物序列为: 27F 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3', 1492R 5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'; 50 μ L 体系: 4 μ L 模板 DNA, 上下游引物各 2 μ L, 25 μ L 2 \times Taq PCR MasterMix (包含 500 μ M dNTP, 0.1 U Taq polymerase/ μ L, 20mM Tris-HCl, 100mM KCl 和 3mM MgCl₂), 17 μ L ddH₂O; 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C, 30s, 58 $^{\circ}$ C, 45s, 72 $^{\circ}$ C, 90s, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C, 延伸 7min。阴性对照用 ddH₂O 作为模板。扩增结束后, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 以凝胶成像系统采集图片并进行结果分析, 然后切胶, 采用 OMEGA 公司 Gel Extraction Kit 试剂盒进行琼脂糖凝胶回收, 回收后的 DNA 作为第二轮 PCR 的模板。第二轮 PCR 引物序列为: HDA1-GC 5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG T-3', HDA2 5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA C-3'; 50 μ L 体系: 4 μ L 模板 DNA, 上下游引物各 2 μ L, 25 μ L 2 \times Taq PCR MasterMix (包含 500 μ M dNTP, 0.1 U Taq polymerase/ μ L, 20mM Tris-HCl, 100mM KCl 和 3mM MgCl₂), 17 μ L ddH₂O; 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C, 30s, 53 $^{\circ}$ C, 30s, 68 $^{\circ}$ C, 30s, 30 个循环, 最后 68 $^{\circ}$ C, 延伸 7min。阴性对照用 ddH₂O 作为模板。扩增结束后, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 以凝胶成像系统采集图片并进行结果分析。

2.4 变性梯度凝胶电泳 (DGGE)

110 制备 8% 聚丙烯酰胺凝胶, 变性梯度浓度为 35%~65%, 呈线性增加, 梯度方向与电泳方向垂直, 用 50 μ L 微量注射器向点样孔中加入 20 μ L 含有适量上样缓冲液的 16S rDNA V3 区 PCR 扩增产物。电泳时, 温度为 60 $^{\circ}$ C, 电压为 120V, 运行 6h。电泳后用 SYBR Green I 核酸染料进行染色, 染料用 1 \times TAE 以 1:10000 稀释, 每次染液用量 15mL, 染色 15min, 共染 3 次。染色完后用凝胶成像系统采集图片并用 Quantity One 4.6.9 软件分析结果。

115 2.5 特征条带回收及物种鉴定

将 DGGE 凝胶上特征条带切下, 加入 50~100 μ L ddH₂O, 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜, 使胶条中 DNA 释放, 以此为模板, 用不含 GC 夹子的 V3 区引物扩增, 反应体系和条件同前第二轮扩增, 扩增产物送英潍捷基 (上海) 公司测序, 将序列在 NCBI BLAST 数据库中比对后获得物种信息。

2.6 统计分析

120 实验数据以均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 表示, 采用 SPSS 17.0 软件的单因素方差分析 (One-way ANOVA), 并用 LSD 法和 Dunnett's T3 法进行事后两两比较分析。采用 Canoco for Windows 4.5 软件进行 PCA 分析。

3 结果

3.1 各组大鼠肠道菌群的 16S rDNA 和 V3 区扩增结果

125 以 4 组不同处理的大鼠肠道微生物基因组 DNA 为模板, 采用巢式 PCR 扩增 16S rDNA 及 V3 区。结果如图 1 所示, 各样品的 16SrDNA V3 区扩增条带特异性和浓度较高, 片段大小均在 200bp 左右, 条带清晰可见。

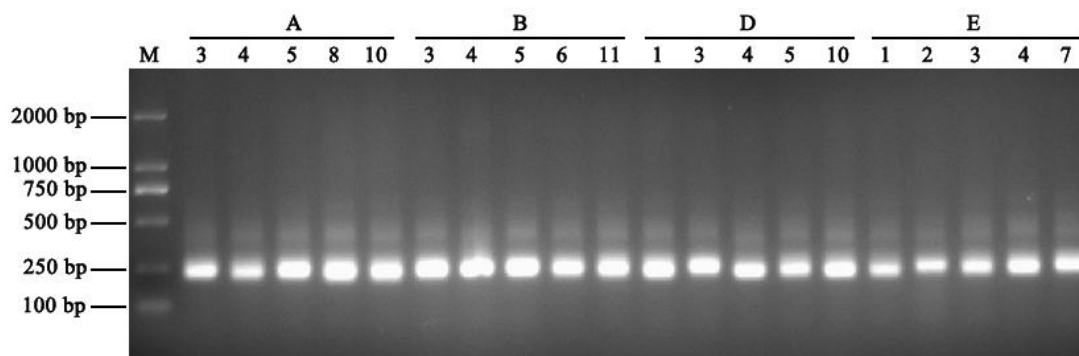


图 1 各组大鼠肠道菌群 16S rDNA V3 区 PCR 扩增结果

Fig 1 The intestinal flora 16S rDNA gene V3 region PCR electrophoresis

3.2 各组大鼠肠道菌群的 DGGE 图谱

如图 2 所示, 各泳道的条带数量和亮度的差异反映了各样品中肠道微生物种群多样性和含量的差异。总体来看, 各泳道的条带均已分开, 且优势特征条带明显。

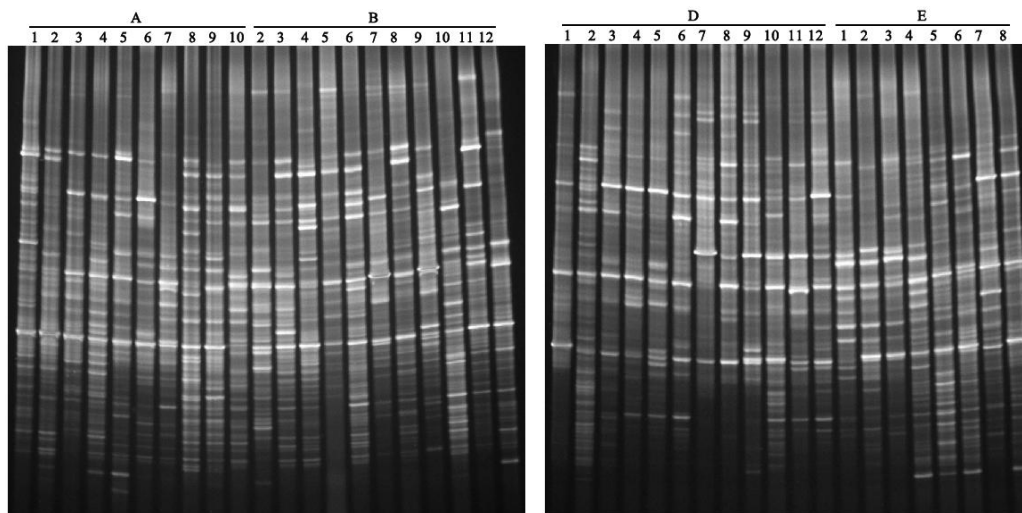


图 2 各组大鼠肠道菌群 16SrDNA V3 区 DGGE 图谱

Fig 2 The intestinal flora 16S rDNA gene V3 region DGGE

3.3 各组大鼠肠道菌群 DGGE 图谱的聚类分析

采用 Quantity One 4.6.9 软件的 UPGMA 算法进行聚类分析, 以了解各组大鼠肠道菌群物种类型和丰度在总体水平上相似度的差异。聚类结果如图 3 所示, 同组样品能大致聚在一簇, 西药组单独成簇, 但中药组 E7 样品未能与同组的其他 4 个样品聚在一起, 可能由于大鼠个体间的差异性所致。

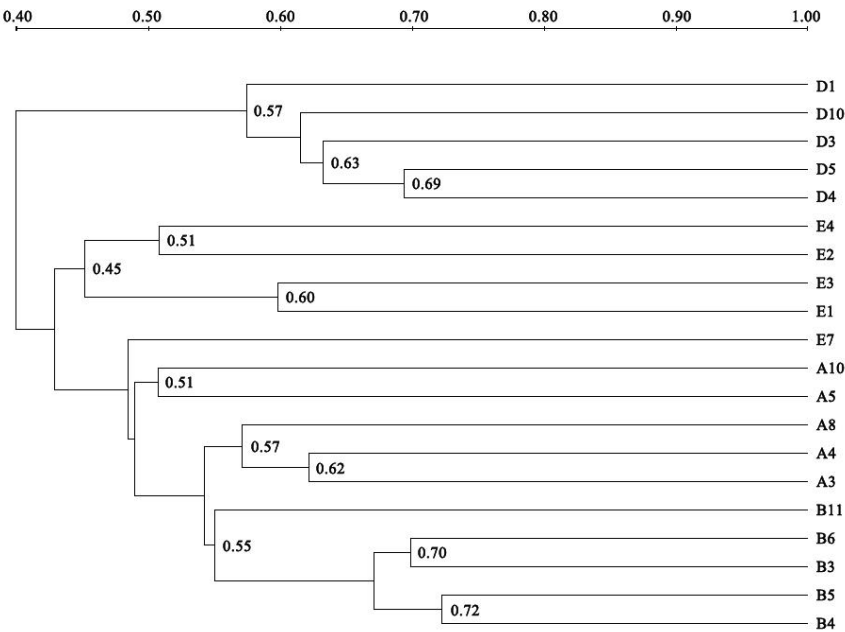


图 3 各组大鼠肠道菌群 DGGE 图谱的 UPGMA 聚类分析
Fig 3 The UPGMA analysis of DGGE of intestinal flora in mice

3.4 各组大鼠肠道菌群 DGGE 图谱的 PCA 分析

采用 Quantity One 4.6.9 软件将每一个泳道（样品）的每一个条带的亮度转换为数值，并用 Canoco for Windows 4.5 软件进行 PCA 分析。结果如图 4 所示，同组样品间距离较小，能大致聚在一起，而不同组间则距离较远，尤其是模型组和中药组、西药组各组内的个体样本距离较近，而空白组组内个体样本距离都较远，与前面的 UPGMA 聚类分析结果一致。

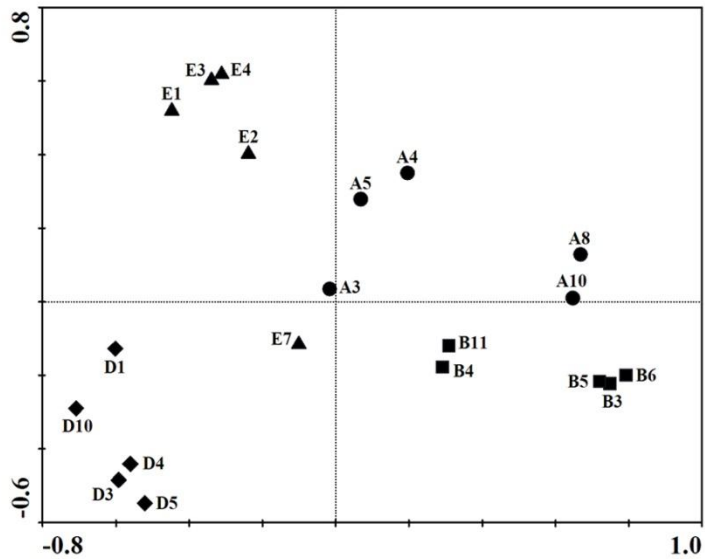


图 4 各组大鼠肠道菌群 DGGE 图谱的 PCA 分析
Fig 4 The intestinal flora PCA of DGGE

3.5 各组大鼠肠道微生物 DGGE 图谱的特征条带回收及物种鉴定

不同药物处理的腹泻模型大鼠肠道微生物绝大部分为不可培养细菌，其中相对丰度最高的为厚壁菌门类细菌，其次为拟杆菌门和变形菌门类细菌。厚壁菌门中主要包括乳杆菌属、

厌氧弧菌属和一些不可培养的未知厚壁菌；拟杆菌门中绝大部分为不可培养的未知拟杆菌，另外还有普氏菌属类细菌；变形菌门中主要包括脱硫弧菌属和一些不可培养的未知 β 变形菌。如图 5 所示。与空白组相比，腹泻模型大鼠肠道厚壁菌门类细菌含量降低，西药和中药处理后其肠道厚壁菌门类细菌含量均显著增加 ($p < 0.001$ 和 $p = 0.007$)，且与空白组相比西药处理组有显著性差异 ($p = 0.009$)，而中药处理组无显著性差异 ($p = 0.273$)，表明中药比西药治疗后更接近正常。与空白组相比，腹泻模型大鼠肠道拟杆菌门类细菌含量增加，西药和中药处理后其肠道拟杆菌门类细菌含量均显著降低 ($p = 0.002$ 和 $p = 0.017$)，且与空白组相比西药处理组有显著性差异 ($p = 0.013$)，而中药处理组无显著性差异 ($p = 0.076$)，表明中药比西药治疗后更接近正常。与空白组相比，腹泻模型大鼠肠道变形菌门类细菌含量无显著变化；西药和中药处理后，与空白组和腹泻模型组相比其肠道变形菌门类细菌含量均无显著变化 ($p > 0.05$)。

4 讨论

大量的临床观察和实验研究表明，肠道菌群（或共生微生物，symbiosis）这个“微生物器官”在维护胃肠道内环境稳定和疾病时发挥着极其重要的作用。肠道菌群与宿主相互作用，形成生理性动态平衡状态。一旦菌群结构和功能发生异常，即微生态失调时就可能引发一系列的生理、病理表现。肠道菌群失调既是小儿腹泻病的易感因素，又是小儿腹泻的病理结果。尤其是小儿迁延性和慢性腹泻与肠道菌群失调密切相关^[3]。微生态制剂的临床应用因此受到广泛关注和重视，但商品化的微生态制剂的安全、疗效问题困扰着医患双方^[4]。采用中医中药（包括针灸）可以调节改善人体免疫功能，抑制肠道机会菌过度繁殖，促进双歧杆菌、乳杆菌生长代谢，对治疗和预防小儿腹泻病起到一定作用^[5]。

本研究所用中药复方系在人参乌梅汤（《温病条辨》）原方基础上，去木瓜，加山楂、石榴皮、广霍香、炮姜组成。方中人参益气，乌梅涩肠生津止渴，山药、莲子甘缓健脾。去木瓜加山楂、石榴皮以加强酸甘化阴、涩肠止泻之功；加广霍香、茯苓，重在理脾醒脾，健脾止泻；一味炮姜，旨在“阴中求阳”温运脾土，加强运脾作用。诸药合用，共奏益气养阴、运脾生津止泻之功。经前期临床和实验研究证明，能减少脾虚泻泄小鼠腹泻次数，明显提高肠道定植抗力，调节肠道菌群以及胃肠粘膜分泌和免疫功能，对腹泻所致的血清电解质浓度和水通道蛋白 4 表达具有调节作用，具有良好的生津止泻效应^{[6][7]}。

PCR-DGGE 能有效地检测粪便中细菌组成的多样性，能直观地反映细菌的组成结构^[8]。本研究 DGGE 图谱的聚类分析及主成分分析结果显示，组内聚拢而组间存在明显差异。特征条带鉴定结果显示，不同药物处理的腹泻模型大鼠肠道微生物相对丰度最高的为厚壁菌门类细菌，其次为拟杆菌门和变形菌门类细菌。腹泻模型大鼠在经中药或西药处理后其肠道厚壁菌门类细菌含量显著增加，而肠道拟杆菌门类细菌含量显著降低，该现象在西药处理中较中药处理组更显著，且与空白组相比，经中药组处理后大鼠菌群更接近空白组。其原因可能是西药妈咪爱系微生态制剂，对因肠道菌群失调腹泻在短期内较之中药的药效更强，作用更快，西药除了在短时间内大量杀灭致病菌外还可能杀灭了部份肠道优势菌群，因此推断中药复方人参乌梅汤加味较之西药对肠道菌群平衡更具有良性的调控作用，可能通过影响肠道菌群结构，纠正菌群紊乱，改善肠道内益生菌的定植能力，抑制致病菌的入侵，加强肠道屏障功能和免疫功能、降低通透性，调节肠道水液代谢，进而发挥生津止泻效应。

[参考文献] (References)

- [1] 梁莉婕,焦立波,高明.建立动物腹泻模型的常用药物及方法的研究进展[J].辽宁中医杂志.2011,38(8):1687-1689.
- [2] 宋红,郑小伟,王颖.多因素复合建立脾气虚证大鼠模型及以方测证研究[J].浙江中医杂志.

志,2008,43(3):136-138.

- 205 [3] 张琪琛,谢晓丽,. 小儿慢性迁延性腹泻 102 例病因分析与治疗对策探讨[J]. 儿科药学杂志,2014,20(08):18-20.
- [4] 武庆斌,. 肠道菌群与腹泻[J]. 中国实用儿科杂志,2010,25(07):504-507.
- [5] 刘作义,程茜.儿科抗生素相关性腹泻[J].中国实用儿科杂志,2010,(07):499-501.
- [6] 刘蓉,赵琼,徐世军.基于酸甘化阴理论的人参乌梅汤抑制小鼠胃肠运动作用研究[J]. 成都中医药大学学报,2011,34(4):42-44.
- 210 [7] 赵琼,徐世军,李秀亮,等.加味人参乌梅汤对 Caco-2 细胞脱水模型 AQP4 基因表达的影响. 中药与临床[J], 2010,1(3):36-38.
- [8] 戎建明,王少东,汪芳裕.炎症性肠病患者肠道菌群结构分析[J].现代中西医结合杂志, 2012, 21(25):2750-2752.