



# 探讨不同浓度的清郁和降汤对反流性食管炎大鼠肠道菌群的影响

周易<sup>1</sup>, 黄雨晴<sup>2</sup>, 叶松<sup>1,2\*</sup>

1 湖北中医药大学中医临床学院, 湖北 武汉 430065

2 湖北省中医院脾胃病科, 湖北 武汉 430061

周易, 黄雨晴, 叶松. 探讨不同浓度的清郁和降汤对反流性食管炎大鼠肠道菌群的影响[J]. 微生物学报, 2023, 63(10): 3987-3999.

ZHOU Yi, HUANG Yuqing, YE Song. Different concentrations of Qingyu Hejiang Decoction regulate intestinal flora in rats with reflux esophagitis[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(10): 3987-3999.

**摘要:**【目的】观察不同浓度的清郁和降汤对反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)的治疗效果, 并探讨其对肠道菌群的影响。【方法】将 36 只健康雄性 SD 大鼠随机分为 6 组, 其中 1 组为假手术组, 剩余 5 组大鼠采用“前胃结扎+外置幽门部分结扎术”手术造模方法建立反流性食管炎模型。造模 2 周后将术后全部存活的 30 只大鼠随机分成对照组、中药高剂量组(予高剂量清郁和降汤)、中药中剂量组(予中剂量清郁和降汤)、中药低剂量组(予低剂量清郁和降汤)、西药组(予泮托拉唑钠肠溶胶囊+枸橼酸莫沙比利分散片+复方嗜酸乳杆菌片), 每组 6 只。于术后第 15 天开始灌胃, 其中假手术组及对照组予蒸馏水灌胃, 其他组分别给予相应的药物灌胃, 持续灌胃 14 d 后将所有大鼠处死后进行取材。以苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察大鼠食管组织的病理学改变; 采用 16S rRNA 基因高通量测序检测其肠道黏膜的菌群构成。【结果】反流性食管炎大鼠存在着较为明显的肠道菌群结构变化及肠道菌群多样性较低的情况, B 组(对照组)中厚壁菌门和拟杆菌门占比减少, 变形菌门占比增多, 且假单胞菌属、青枯菌属等细菌增多。低、中、高 3 种浓度的清郁和降汤均能够提升 RE 大鼠的肠道菌群多样性, 增加拟杆菌门及厚壁菌门, 降低变形菌门的占比, 从属水平上看, 清郁和降汤能够提升大鼠肠道中拟杆菌属、乳杆菌属、瘤胃球菌属、颤螺旋菌属、双歧杆菌属和狄氏副拟杆菌属等益生菌占比。以 D 组(中剂量组)对大鼠肠道菌群多

资助项目: 叶松全国名老中医专家传承工作室建设项目(国中医药人教函[2022]75 号); 湖北省科技厅 2022 年度省自然科学基金创新发展联合基金项目(2022CFD141)

This work was supported by the Ye Song National Famous Traditional Chinese Medicine Expert Inheritance Studio Construction Project (Guozhong Pharmaceutical Renjiao Letter [2022] No. 75) and the 2022 Provincial Natural Science Foundation Innovation and Development Joint Fund Project of Hubei Provincial Department of Science and Technology (2022CFD141).

\*Corresponding author. E-mail: afk548@163.com

Received: 2023-03-06; Accepted: 2023-05-10; Published online: 2023-05-16

样性提升最为明显，其效果最接近假手术组。特征微生物方面，B组以变形菌门为特征性微生物，D、E两组出现了放线菌门及拟杆菌门下属细菌为特征微生物的情况，在门水平与F组相同。【结论】清郁和降汤能够有效地治疗反流性食管炎，其机制可能与改变RE大鼠的肠道菌群结构、减少有害菌、提升益生菌的占比和改善肠道菌群多样性有关。

关键词：反流性食管炎；清郁和降汤；肠道菌群；大鼠疾病模型

## Different concentrations of Qingyu Hejiang Decoction regulate intestinal flora in rats with reflux esophagitis

ZHOU Yi<sup>1</sup>, HUANG Yuqing<sup>2</sup>, YE Song<sup>1,2\*</sup>

1 Clinical College of Traditional Chinese Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, Hubei, China

2 Department of Spleen and Gastroenterology, Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei, China

**Abstract: [Objective]** To observe the effects of different concentrations of Qingyu Hejiang Decoction on reflux esophagitis (RE) and intestinal flora. **[Methods]** Thirty-six healthy male SD rats were randomly assigned into six groups. Except the sham operation group, the remaining five groups received anterior gastric ligation+external partial pyloric ligation for the modeling of RE. Two weeks after modeling, all the 30 surviving rats were randomly assigned into a sham operation group, a control group, a western medicine (pantoprazole sodium enteric-coated capsules+mosapride citrate dispersible tablets+compound lactobacillus acidophilus tablets) group, and high-, medium-, and low-dose Qingyu Hejiang Decoction groups ( $n=6$ ). The rats in the sham operation group, the control group, and other groups were administrated with distilled water, distilled water, and corresponding drugs, respectively, by gavage. After 14 days of intervention, all the rats were sacrificed for the collection of tissue samples. The pathological changes of the esophageal tissue were observed *via* hematoxylin-eosin (HE) staining, and 16S rRNA gene high-throughput sequencing was employed to determine the bacterial composition in the intestinal mucosa. **[Results]** The RE rats showed significant changes and low diversity of intestinal flora. The control group showed decreased relative abundance of *Firmicutes* and *Bacteroidetes*, increased relative abundance of *Proteobacteria*, and increased *Pseudomonas* and *Ralstonia*. Low-, medium-, and high-dose Qingyu Hejiang Decoction increased the diversity of intestinal flora in RE rats. Specifically, they increased the relative abundance of *Firmicutes* and *Bacteroidetes* and reduced that of *Proteobacteria*. At the genus level, Qingyu Hejiang Decoction increased the relative abundance of probiotics such as *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Ruminococcus*, *Oscillospira*, *Bifidobacterium*, and *Parabacteroides* in the intestinal tract of RE rats. Moreover, the medium-dose group demonstrated the best performance, with the intestinal microflora diversity close to that of the sham operation group. *Proteobacteria* was the characteristic microorganisms in the control

group, while *Actinomycetes* and *Bacteroidetes* were the characteristic microorganisms in the medium- and high-dose Qingyu Hejiang Decoction groups, which were the same as those in the western medicine group. **[Conclusion]** Qingyu Hejiang Decoction can effectively treat RE by reshaping the intestinal flora structure (reducing harmful bacteria, increasing probiotics, and increasing the diversity of intestinal flora).

**Keywords:** reflux esophagitis; Qingyu Hejiang Decoction; intestinal flora; rat disease model

胃食管反流病 (gastroesophageal reflux disease, GERD) 目前已成为世界范围内的常见病, 其症状表现复杂, 典型症状为反复发作的烧心和反酸, 其他症状还包括胸痛、腹痛、腹胀、吞咽困难、咽部异物感、咳嗽和咽喉炎等。目前可将其分为非糜烂性反流病 (non-erosive reflux diseases, NERD)、反流性食管炎 (reflux esophagitis, RE) 和 Barrett 食管 (Barrett's esophagitis, BE)<sup>[1]</sup>。2020 年国内一项基于社区人群的 Meta 分析显示, 中国社区人群中 GERD 患病率为 7.69%<sup>[2]</sup>。从地理位置及饮食生活习惯较为相近的东亚来看, 韩国从 2005 年开始, 仅过了 3 年的时间, 其 RE 的发病率就增长为 7.3%; 同样地, 日本 RE 发病率也呈现逐渐升高的态势, 在 2010 年时达到 13.1%<sup>[3]</sup>。目前我国 RE 发病率虽低于欧美地区, 但已与日韩等东亚地区相近, 且发病率在不断提高<sup>[4]</sup>。目前认为, RE 的发病可能与抗反流防御功能的减弱、反流物对食管黏膜的攻击作用增强、胃排空延迟、食管高敏感、遗传因素及精神心理因素等及免疫因素等有关<sup>[4]</sup>。

在治疗上, 目前 RE 的治疗目标以缓解症状、治愈食管炎、提高生活质量、预防复发及并发症为主<sup>[3]</sup>。现阶段, 质子泵抑制剂 (proton pump inhibitors, PPI) 依旧是治疗 RE 的首选药物, 然而长期使用 PPI 类药物可出现营养不良、骨质疏松和骨折、心脑血管疾病和慢性肾损伤等副作用<sup>[5]</sup>, 而以 P-CAB (钾离子竞争性酸阻滞剂) 为代表的新药, 存在上市时间短、副作用较多、应用不够充分等问题<sup>[6-7]</sup>; 其他治疗方案诸如抗反流

手术、内镜治疗等, 均存在如复发率高、并发症多、经济负担高等缺陷<sup>[3]</sup>。而中医药在治疗 RE 时, 能够弥补 RE 常规治疗的弊端<sup>[8]</sup>。

叶松教授对中医药治疗 RE 有着独到的见解。其根据柴胡疏肝散和左金丸加减而成的“清郁和降汤”在临证中取得了较为满意的疗效<sup>[9]</sup>。已经证实, 清郁和降汤能够通过影响 LPS/TLR4/NF- $\kappa$ B 通路的相关表达, 对食管菌群产生影响, 从而达到对 RE 的治疗作用<sup>[10-11]</sup>。多种中药中活性成分, 在人体肠道中能够与肠道菌群相互影响, 通过影响酶及代谢通路, 进而对机体产生不同的生物学效应<sup>[12]</sup>, 因此, 本研究通过手术方法建立反流性食管炎大鼠病理模型, 通过观察清郁和降汤对 RE 大鼠的疗效及对肠道菌群的影响, 进一步探讨清郁和降汤治疗 RE 的相关机制, 为临床治疗 RE 提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

购入无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级雄性 SD 大鼠 36 只, 大鼠体重在 180–200 g 之间, 以标准温度及湿度饲养于湖北中医药大学实验动物中心 SPF 级实验室, 随机分笼后自由进食饮水, 所有大鼠进行适应性喂养 7 d 后开始进行造模。实验动物由三峡大学实验动物中心购入, 许可证号: SCXK (鄂) 2022-0012。本实验全程严格按照相应实验动物伦理准则进行 (湖北中医药大学实验动物伦理审批编号 HUCMS 202204018)。

## 1.2 药物

清郁和降汤的药物组成：柴胡 10 g、枳壳 10 g、厚朴 10 g、炒莱菔子 15 g、陈皮 10 g、砂仁 6 g、黄连 6 g、吴茱萸 3 g、佛手 10 g、香橡皮 10 g、郁金 10 g、延胡索 10 g、川楝子 10 g、赤芍 10 g、白芍 10 g、海螵蛸 10 g。所有中药均由湖北省中医院中药房提供，所有药物剂量均以《中华人民共和国药典》(2020 版)为标准进行使用。成人用量为日 1 剂，1 日 2 次，每次 200 mL，通过体表面积换算后，大鼠的每日生药量为 15.8 g/kg。将所有药物经自动煎药机进行煎煮、浓缩后，制备不同浓度的 3 种药液，其中，中剂量组浓度为 2 g/mL 的中药液，高剂量组浓度为 4 g/mL，低剂量组浓度为 1 g/mL，所有药液平日放置于 4 °C 冰箱中储存。西药：泮托拉唑钠肠溶片(湖南九典制药股份有限公司生产，40 mg/片)；枸橼酸莫沙比利片(成都康弘药业集团股份有限公司，5 mg/片)；复方嗜酸乳杆菌片(通化金马药业集团股份有限公司，0.5 g/片)换算后可得出大鼠用量分别为泮托拉唑钠肠溶片 8.4 mg/kg、枸橼酸莫沙比利片 0.19 mg/kg、复方嗜酸乳杆菌片 157.5 mg/kg。每次灌胃前使用蒸馏水将上述药物进行充分研磨，配制相应浓度的混悬液。

## 1.3 试剂

缓冲液：Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer, New England Biolabs; 酶：Phusion® High-Fidelity DNA polymerase, New England Biolabs; 2% agarose gels, Biowest; PCR 产物纯化 Universal DNA 纯化回收试剂盒, TianGen; 建库试剂盒进行文库的构建：NEB Next® Ultra DNA Library Prep Kit, Illumina。

## 1.4 仪器

RM2016 病理切片机(上海徕卡仪器有限公司); Nikon Eclipse E100 正置光学显微镜,

NikonDS-U3 成像系统(尼康); CR21GII 高速冷冻离心机(HITACHI); ABI 5700 型荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems); FlexStation 3 多功能酶标仪(Molecular Devices); DYCZ-24DN 垂直电泳槽, DYCZ-40 电转仪, 核酸电泳仪(DYCP-32C 型琼脂糖水平电泳仪) (北京六一仪器厂); TS-1 水平摇床(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司); LP115 pH 计(Metter-Toledo GmbH 公司); CPA 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); Covaris 超声波破碎仪(Covaris S2 System); Qubit Fluorometric Quantification (Thermo Scientific); 安捷伦 Agilent 5400 生物分析仪(Agilent Technologies Co Ltd.); PCR 仪(Bio-Rad); 测序仪(Illumina)。

## 1.5 模型制备

36 只 SD 大鼠中随机选取 6 只为假手术组，其余 30 只大鼠随机分为 5 组，进行手术造模。造模方法采用与之前研究中相同的造模方法<sup>[10]</sup>，即“前胃结扎+外置幽门部分结扎术”，具体手术步骤为：所有大鼠于术前 24 h 开始禁食，自由饮水。造模时，以 10% 水合氯醛(0.3 mL/100 g) 进行腹腔注射麻醉，麻醉后进行备皮，沿腹中线中段开腹，开口约 2 cm，寻找胃部组织并向下拉出，充分游离胃部及幽门附近组织，以 3-0 线绕过前胃并将前胃进行结扎，后以 3-0 线绕过幽门，将直径为 0.38 mm 的玻璃棒置于幽门上，将幽门与玻璃棒一同进行结扎后抽出玻璃棒；最后将胃部放入原位置后关腹。假手术组大鼠以同样方式进行麻醉、开腹，将胃部组织提出暴露约 5 min 后，放回原位置，关腹。造模后所有大鼠予以常规消毒后放回动物房中，术后第 1 天所有大鼠予以禁食不禁水，术后第 2 天所有大鼠予以少量进食，术后第 3 天所有大鼠恢复正常饮食，造模后 2 周，所有大鼠均存活。

### 1.5.1 再分组及给药

2 周后将 30 只大鼠随机分为对照组、中药高剂量组、中药中剂量组、中药低剂量组、西药组, 每组 6 只。所有大鼠于术后第 15 天开始灌胃, 中药低、中、高剂量组分别以低、中、高剂量清郁和降汤灌胃; 西药组予以泮托拉唑+莫沙比利+嗜酸乳杆菌混悬液灌胃, 假手术组及对照组以蒸馏水灌胃。以上药物及蒸馏水均以大鼠体重的 1 mL/100 g 进行灌胃, 每日 1 次, 连续灌胃 14 d。

### 1.5.2 取材

所有大鼠连续灌胃 14 d 后, 禁食不禁水 24 h。准备相关器材进行取材, 取材时, 所有大鼠均以 10%水合氯醛进行腹腔注射(0.3 mL/100 g)麻醉, 然后常规开腹, 找出胃贲门处, 取贲门处及向上 2 cm 食管组织, 截取肛门口向上约 3 cm 处直肠黏膜 1 块, 长度约 1.5–2.0 cm, 用镊子将内容物挤出。最后将食管组织置于 4%多聚甲醛溶液中进行固定和保存, 肠道黏膜存放于–80 °C冰箱待检。

## 1.6 观察指标及方法

### 1.6.1 一般情况

每日对各组大鼠的体重、进食量、饮水量、精神状态和大便性状进行观察并记录。将所有大鼠进行分类, 其中 A 组指代假手术组, B 组指代对照组, C 组指代低剂量组, D 组指代中剂量组, E 组指代高剂量组, F 组指代西药组。下文菌群分析内容分组同上。

### 1.6.2 食管黏膜病理学观察

将保存的食管组织进行包埋后, 制备常规病理切片, 予以苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色后, 在显微镜下观察各组大鼠食管黏膜病理形态学表现, 并根据中华医学会消化内镜分会制定的《反流性食管炎诊断及治疗指南(2003 年)》进行食管黏膜的病理分级。

### 1.6.3 肠道菌群分析

(1) DNA 抽提和 PCR 扩增; 采用十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)对大鼠直肠黏膜的基因组 DNA 进行提取, 然后使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓度, 合格后, 使用无菌水将样品于离心管中稀释至 1 ng/ $\mu$ L。用 341F 和 806R 引物对 V3–V4 可变区进行 PCR 扩增。

(2) PCR 产物的纯化和混样; 根据步骤(1)中产物浓度进行等量混样, 混合均匀后以 2%浓度的琼脂糖凝胶进行电泳, 纯化步骤(1)产物, 所使用的试剂盒为 Universal DNA (TianGen)。

(3) 文库构建和上机测序; 构建文库, 试剂盒为 NEB Next<sup>®</sup> Ultra DNA Library Prep Kit, 然后使用安捷伦 5400 进行文库检测和 Q-PCR 定量; 最后使用 NovaSeq 6000 进行计算机测序。

(4) 信息分析; 导入原始序列, 用 Qiime tools import 插件进行处理; 然后以 QIIME2 feature-classifier 插件进行物种分类, 再使用 ANCOM、ANOVA、Kruskal Wallis 等方法鉴定分组和样本间细菌丰度的差异。最后计算多样性矩阵、特征序列水平  $\alpha$  多样性指数、 $\beta$  多样性指数、微生物群落与相关环境因子之间的潜在关联等多个指标并以多种图表的形式展示。

### 1.7 统计学分析

使用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析。若数据符合正态分布, 采用单因素方差分析, 组间两两比较用最小显著性差异法(least significant difference, LSD)-*t* 检验; 若数据为非正态分布, 则采用非参数秩和检验。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 大鼠一般情况

所有大鼠均存活, 其中假手术组大鼠毛发色

泽光鲜、精神充沛、活动敏捷，食量较多；予以造模手术的大鼠均有不同程度的精神萎靡、活动减少、毛发色泽晦暗、进食饮水量减少等表现；灌胃 2 周后，接受手术干预的大鼠一般情况均有改善；假手术组大鼠平均体重最高，为(360±15) g；中药中剂量组次之，为(300±10) g，对照组大鼠体重最低，为(220±18) g，4 组药物干预组大鼠体重无明显差异( $P>0.05$ )。

## 2.2 各组大鼠食管病理学表现

病理学表现(图 1)：假手术组大鼠食管黏膜中未见明显炎症反应，对照组大鼠可见食管鳞状上皮增厚并伴有基底细胞增生，大量炎性细胞浸润，严重者可见黏膜糜烂或溃疡。3 组中药组及西药组大鼠食管黏膜鳞状上皮增生较少，极少量慢性炎性细胞浸润，细胞间隙增宽，

未见糜烂或溃疡。图 1 中英文代表大鼠食管病理切片所属分组。

## 2.3 各组大鼠肠道菌群结果

### 2.3.1 $\alpha$ 多样性分析

$\alpha$ 多样性指数是指样品中物种的多样性，共有 2 个因素，即所检测样品中的物种组成丰富度和均匀度，以 Shannon 等指数对此进行评估，其中指数的增高，则代表所检测样本多样性的提高，该计算方法是以前样品中的分类操作单元(operational taxonomic unit, OTU) (菌群)总数和每个 OTU 所占的比例为基础进行运算。具体内容见图 2。另外，得到了整体的  $\alpha$ 多样性指数之后，在图 3 中结合分组信息用 Kruskal Wallis 方法比较在各个样品分组之间  $\alpha$ 多样性指数是否有显著性差异。

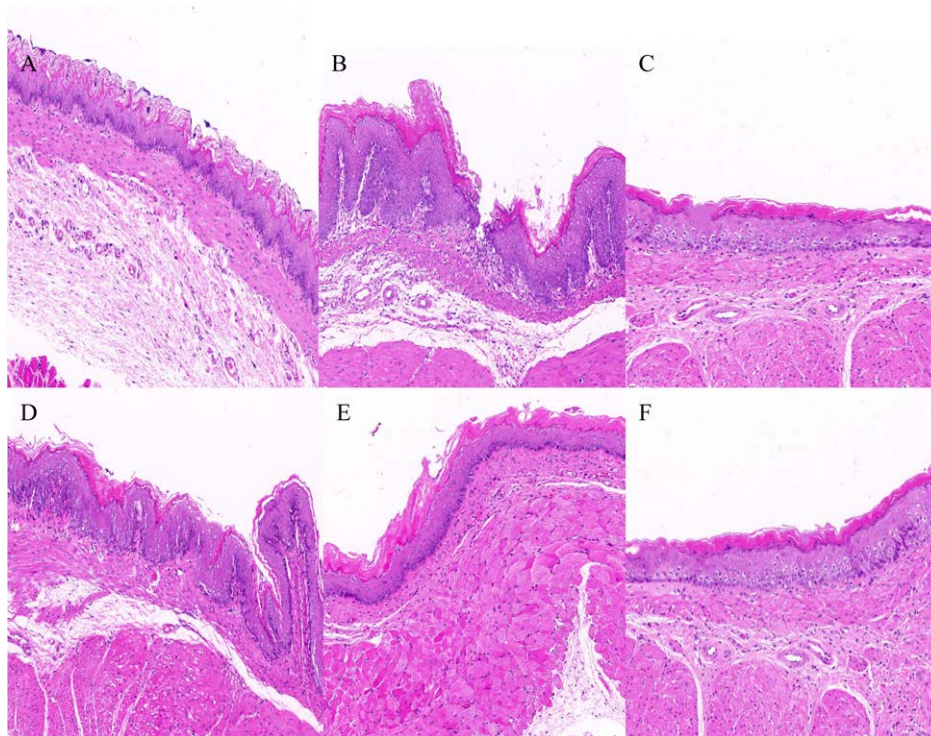


图 1 各组大鼠食管组织病理学表现(HE, 100×)

Figure 1 Histopathological manifestations of rat esophagus in each group (HE, 100×). Group A is a Sham surgery group, Group B is a control group, Group C is a low-dose group, Group D is a medium dose group, Group E is a high-dose group, and Group F is a western medicine group.



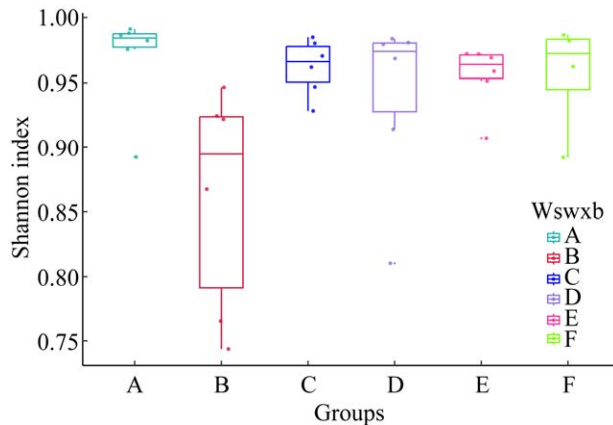


图 2 Shannon 指数的箱型图

Figure 2 Box diagram of Shannon index. A, B, C, D and E refers to the same content as Figure 1. The same below.

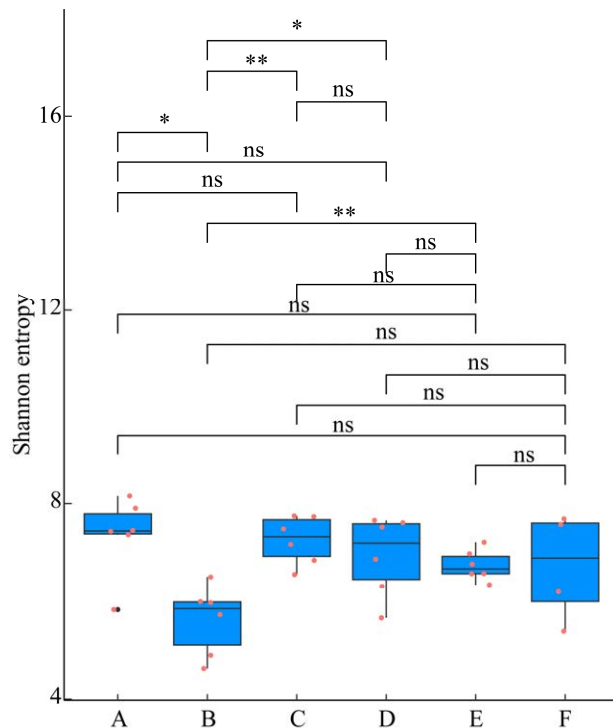


图 3 Shannon 指数的组间多重比较

Figure 3 Multiple comparison between groups of Shannon index. The \* and \*\* shown in the figure represent  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively, indicating that after comparison, the original hypothesis was rejected, meaning that there was a significant difference in the two groups of microbiota. The X-axis in the figure represents the group name. ns represents no statistically significant comparison between groups.

图 2 的 Shannon 指数表明, B 组组内的物种多样性最低, 而 A 组组内物种多样性最高, 说明反流性食管炎大鼠肠道菌群的多样性明显降低, 而清郁和降汤及西药联用后均能够明显改善其肠道菌群中的多样性。图 3 中, B 组和 A、C、D、E 之间出现了  $P < 0.05$  的情况, 说明予以清郁和降汤进行干预后, 大鼠肠道菌群多样性与正常组无明显差异

### 2.3.2 $\beta$ 多样性分析

在对比不同样品之间的物种多样性时, 使用  $\beta$  多样性进行分析。在得到整体的  $\beta$  多样性指数之后, 接下来结合分组信息来比较在各个样品分组之间的微生物组成结构是否有显著性差异, 图 4 的箱线图中, 横坐标显示为样品分组, 6 组箱型图分别代表了每组样品与其他组的组间差异性, 图中纵坐标则表示所比较的样品之间的差距。然后通过 ANOSIM 方法计算出  $P$ 、 $Q$  值,  $Q$  值是校正过的  $P$  值, 更具参考价值,  $Q < 0.05$  可推断组间菌群结构存在显著差异。

结合图 4 的结果, 通过与其他 5 组进行对比, B 组  $Q$  值均  $< 0.05$ , 说明 B 组菌群与其他 5 组菌群存在较为明显的差异; A、C、D、E 四组样本之间对比  $Q$  值均  $> 0.05$ , 说明清郁和降汤对于大鼠肠道菌群产生与假手术组均无明显的差异性。另外, 相较于 B 组及 F 组, C、D、E 三组大鼠肠道菌群的分布与假手术组更为接近。

### 2.3.3 组间菌群组成分析

该部分分析了不同样本中物种组成的区别, 对所有 OTU 进行分析后, 选出具有代表性的序列, 然后对比数据库中的信息, 得到物种注释信息。在此基础上, 排除叶绿体、线粒体以及其他无法注释的 OTU 序列, 便可以对所检测样品的 OTU 绝对丰度进行排序。具体排序沿用微生物学中常规分类, 即界(kingdom)、门(phylum)、纲(class)、目(order)、科(family)、属(genus)和种(species)的分类方法, 按照其中不同菌群所占比例进行排序和统计, 图 5 展示了每个样本中 OTU 在属水平的变化程度。

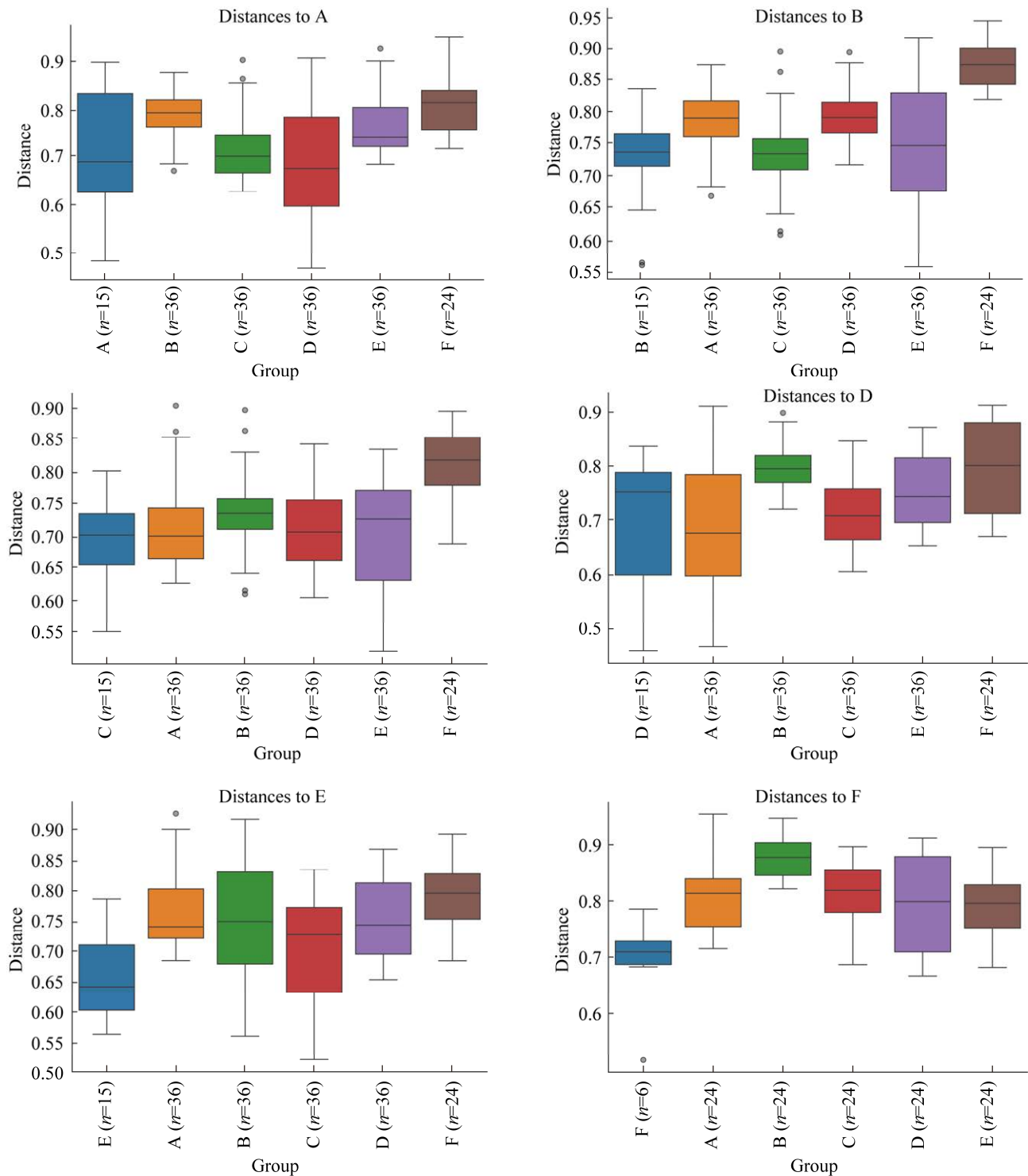


图 4 六组菌群组间结构差异显著性分析结果

Figure 4 Analysis results of structural differences between six groups of bacteria. The middle line represents the median of the data, while the upper and lower edges represent the maximum and minimum values of the group of data; The point beyond the box area is the outlier in data analysis.



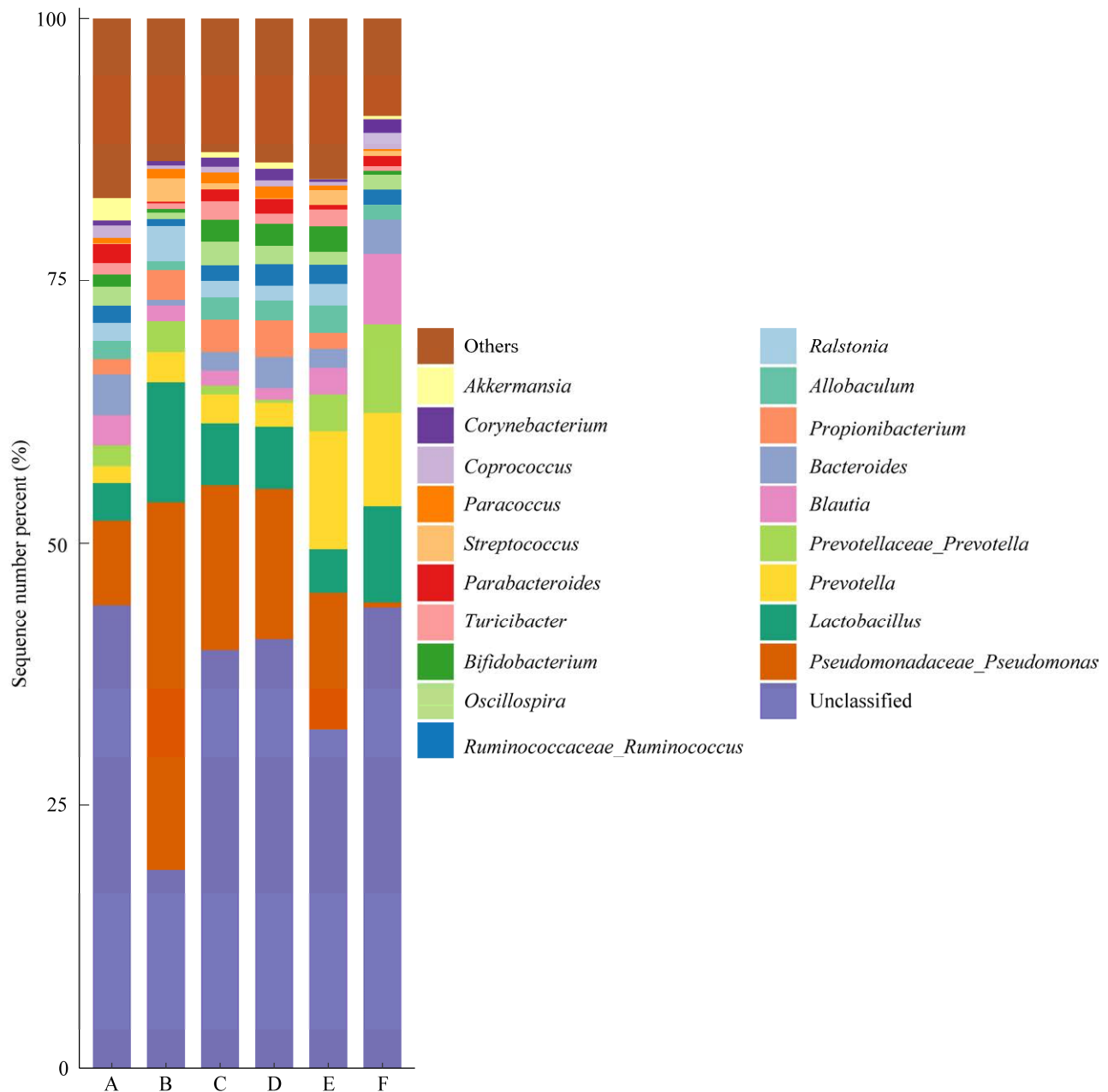


图 5 属水平上的菌群构成

Figure 5 Composition of flora at genus level. The abscissa is the group name, and the ordinate (sequence number percent) represents the ratio of the number of sequences annotated to the door level to the total annotated data; The color order of the histogram from top to bottom corresponds to the legend color order in Figure 9; Sequences without annotations are classified as unclassified. The legend shows at most 20 dominant species, and the remaining species with relatively low abundance are classified as Others.

通过上文所展示的肠道菌群分析结果可以发现。除开 Others 及 Unclassified 类细菌中，假单胞菌属 (*Pseudomonadaceae*

*pseudomonas*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、青枯菌属 (*Ralstonia*)、链球菌属 (*Streptococcus*) 占比较 A、C、D、E 四组明显增高；拟杆菌属

(*Bacteroides*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、颤螺旋菌属(*Oscillospira*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、*Turicibacter*属、狄氏副拟杆菌属(*Parabacteroides*)、粪球菌属(*Coprococcus*)占比较 A、C、D、E 四组明显降低。

而经黏液真杆菌属(*Blautia*)、丙酸杆菌属(*Propionibacterium*)、副球菌属(*Paracoccus*)、棒状杆菌(*Corynebacterium*)和嗜黏蛋白阿克曼菌属(*Akkermansia*)在 6 组中的变化中无明显规律性。

### 2.3.4 组间 OTU 差异显著性分析

运用线性判别分析 [line discriminant analysis (LDA) effect size, LEfSe] 方法, 基于相对丰度表, 通过非参数检验和线性判别分析的结合, 寻找每一个分组的特征微生物, 即相对于其他分组, 该组中丰度较高的微生物, 具体见图 6; 图 6 中, 由内到外, 分别对应界、门、纲、目、科、属不同的分类层级, 以连线代表所属关系。每个圆

圈为一个节点, 代表一个物种, 所有黄色节点表示差异不显著, 有颜色的扇形区域标注了特征微生物的下属分类区间。最后, 以统计学方法计算出的  $P$  值来判断组间特征微生物的差异性。

经过统计学计算后, 总结了各组  $P < 0.05$  的菌群(即与其他组进行对比后具备显著性差异的数据)。

A 组以拟杆菌门中的拟杆菌科(*Bacteroidaceae*)、属, 类普雷沃氏菌科下属菌(YRC22), 狄氏副拟杆菌属(*Parabacteroides*), 紫单胞菌科, 厚壁菌门的颤螺旋菌属(*Oscillospira*), 变形菌门的德克斯氏菌属(*Derxia*), 产碱菌科(*Alcaligenaceae*), 伯克氏菌目(*Burkholderiales*),  $\beta$ -变形菌纲(*Betaproteobacteria*), 疣微菌门、纲、目、科(*Verrucomicrobia*)为特征微生物。B 组以变形菌门中  $\gamma$ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*), 假单

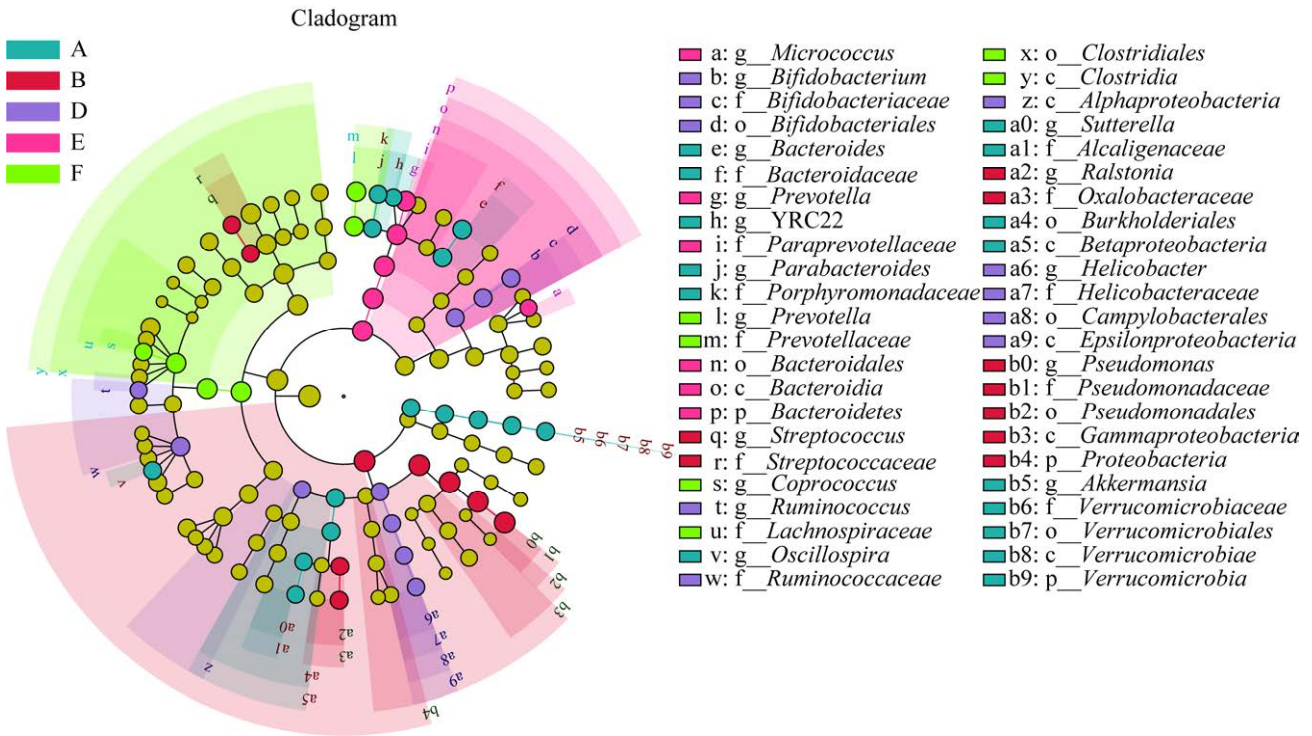


图 6 LEfSe 分析 cladogram

Figure 6 LEfSe analysis cladogram.

胞菌目、科、属(*Pseudomonadales*), 草酸杆菌科(*Oxalobacteraceae*), 青枯菌属(*Ralstonia*)为特征微生物。在同样标准下, C组中无符合要求的特征微生物。D组以放线菌门中双歧杆菌目、属(*Bifidobacterium*), 厚壁菌门中瘤胃球菌科(*Ruminococcaceae*)、属为特征微生物。E组放线菌门的微球菌属(*Micrococcus*)、拟杆菌门中拟杆菌纲、目(*Bacteroidales*), 普雷沃氏菌属(*Prevotella*)为特征微生物。F组以放线菌门的罗氏菌属(*Rothia*), 拟杆菌门的普雷沃氏菌科、属为特征微生物。

### 3 讨论与结论

目前对于 RE 与肠道菌群的研究已越来越多。段欣慧<sup>[13]</sup>的研究发现, 中药通降合剂治疗肝胃郁热型 RE 患者能够取得较为优良的临床疗效, 且具有抑菌、调菌的功效, 能恢复患者肠道菌群的多样性的功能<sup>[14]</sup>。尹红等<sup>[15]</sup>的研究表明, 中药经验方剂“活血通降方”能够善肠道菌群组成, 显著增加有益菌的丰度, 降低革兰阴性菌、拟杆菌属的相对丰度, 进而降低炎症因子的表达, 达到对反流性食管炎的治疗作用。

结合本研究结果, 发现反流性食管炎大鼠存在着较为明显的肠道菌群多样性降低及菌群占比紊乱的现象, 而应用清郁和降汤能够纠正其紊乱, 增加拟杆菌门及厚壁菌门的占比, 降低变形菌门的占比并提升肠道菌群的多样性, 中药干预后的 3 组大鼠肠道菌群结构与假手术组无明显差异; 以中剂量组对大鼠肠道菌群多样性提升最为明显。从属水平上看, B 组(对照组)中, 假单胞菌属、乳杆菌属、青枯菌属和链球菌属占比明显高于剩余 5 组; 其中, 假单胞菌分布广泛, 在土壤、水和空气中均有存在, 属于条件致病菌, 常因来源于环境、污染的医疗器械、输液或注射等方式感染人体<sup>[16]</sup>。链球菌为一类条件致病菌,

常于机体抵抗力下降时引发多个部分的严重感染<sup>[17]</sup>。与此同时, 相较于其他 5 组, B 组占比较低的菌群中, 拟杆菌中特定的拟杆菌能够发挥抗炎、改善溃疡性结肠炎的效果<sup>[18]</sup>。颤螺旋菌属作为候选的益生菌之一, 目前认为能够发挥抗感染、改善能量代谢等作用<sup>[19]</sup>; 双歧杆菌是应用较为广泛的益生菌<sup>[20]</sup>; 瘤胃球菌和 *Turicibacter* 属、狄氏副拟杆菌也是与机体能量代谢有关的益生菌, 能够产生丁酸盐和其他短链脂肪酸, 进而对肠道产生影响<sup>[21-23]</sup>。另外, 乳杆菌属虽然在 B 组中占比较高, 结合图 5 中的结果, 认为清郁和降汤能够提升乳杆菌的占比。特征微生物方面, 3 种浓度的清郁和降汤对大鼠肠道菌群中特征微生物影响有所不同, 低剂量组无特征微生物, 中、高剂量组则出现了以放线菌门及拟杆菌门下属特征微生物的情况, 在门水平与 F 组(西药组)变化相同。

综上所述, 清郁和降汤对反流性食管炎大鼠产生了良好的疗效, 其机制可能与提升 RE 大鼠的肠道菌群多样性; 提升厚壁菌门及拟杆菌门中拟杆菌属、乳杆菌属、瘤胃球菌属、颤螺旋菌属、双歧杆菌属、*Turicibacter* 属、狄氏副拟杆菌属和粪球菌属等益生菌的占比, 降低假单胞菌属、链球菌属等有害菌的占比有关, 在中剂量清郁和降汤的干预下, 大鼠肠道菌群结构最接近假手术组。

### 参考文献

- [1] 李军祥, 陈諳, 李岩. 胃食管反流病中西医结合诊疗共识意见(2017 年)[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2018, 26(3): 221-226, 232.  
LI JX, CHEN J, LI Y. Consensus on the diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease by combining traditional Chinese and Western medicine (2017)[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Digestion, 2018, 26(3): 221-226, 232 (in Chinese).

- [2] 周金池, 赵曙光, 王新, 魏延, 韩伟, 程浩, 李丽丽, 窦维佳, 刘震雄. 中国部分地区基于社区人群胃食管反流病患病率 Meta 分析[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2020, 29(9): 1012-1020.  
ZHOU JC, ZHAO SG, WANG X, WEI Y, HAN W, CHENG H, LI LL, DOU WJ, LIU ZX. Meta-analysis of the prevalence of gastroesophageal reflux disease based on community population in some areas of China[J]. *Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2020, 29(9): 1012-1020 (in Chinese).
- [3] 汪忠镐, 吴继敏, 胡志伟, 陈冬. 中国胃食管反流病多学科诊疗共识[J]. 中华胃食管反流病电子杂志, 2020, 7(1): 1-28.  
WANG ZG, WU JM, HU ZW, CHEN D. Consensus on multidisciplinary diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease in China[J]. *Chinese Journal of Gastroesophageal Reflux Disease (Electronic Edition)*, 2020, 7(1): 1-28 (in Chinese).
- [4] 中华医学会消化病学分会. 2020 年中国胃食管反流病专家共识[J]. 中华消化杂志, 2020, 40(10): 649-663. Digestive Branch of Chinese Medical Association. Chinese expert consensus of gastroesophageal reflux disease in 2020[J]. *Chinese Journal of Digestion*, 2020, 40(10): 649-663 (in Chinese).
- [5] SANDHU DS, FASS R. Current trends in the management of gastroesophageal reflux disease[J]. *Gut and Liver*, 2018, 12(1): 7-16.
- [6] 许文涛, 许向波, 任天舒, 祁兴顺. 伏诺拉生治疗胃食管反流病的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2021, 29(21): 1248-1253.  
XU WT, XU XB, REN TS, QI XS. Vonoprazan for treatment of gastroesophageal reflux disease: research advances[J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2021, 29(21): 1248-1253 (in Chinese).
- [7] 日本药品和医疗器械管理局(PMDA). 日本修订含富马酸伏诺拉生药品说明书增加肝损害、过敏及休克的风险提示[J]. 中国医药指南杂志, 2020, 22(11): 767.  
Japan Medicines and Medical Devices Administration (PMDA). Japan revised the instructions for fumarate containing fumarate to increase the risk of liver damage, allergies, and shock [J]. *Chinese Medical Journal*, 2020, 22(11): 767 (in Chinese).
- [8] 陈静, 曹正民, 徐蕾, 吕文良. 中医药治疗反流性食管炎作用机制研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(7): 177-181.  
CHEN J, CAO ZM, XU L, LYU WL. Research progress on mechanism of traditional Chinese medicine in treatment of reflux esophagitis[J]. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*, 2022, 40(7): 177-181 (in Chinese).
- [9] 罗樱. 清郁和降汤联合奥美拉唑治疗肝胃郁热型非糜烂性反流病的临床观察[D]. 武汉: 湖北中医药大学硕士学位论文, 2017.  
LUO Y. Clinical observation on the treatment of non erosive reflux disease of liver stomach heat stagnation type with Qingyu Hejiang Tang and omeprazole[D]. Wuhan: Master's Thesis of Hubei University of Chinese Medicine, 2017 (in Chinese).
- [10] 黄雨晴, 周易, 黄鹤, 叶松. 清郁和降汤对反流性食管炎模型大鼠食管组织 LPS/TLR4/NF- $\kappa$ B 通路及食管黏膜屏障的影响[J]. 中医杂志, 2022, 63(22): 2170-2178.  
HUANG YQ, ZHOU Y, HUANG H, YE S. Effect of Qingyu Hejiang Decoction on LPS/TLR4/NF- $\kappa$ B pathway and esophageal mucosal barrier in reflux esophagitis model rats[J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2022, 63(22): 2170-2178 (in Chinese).
- [11] 黄雨晴. 基于食管菌群探讨清郁和降汤对反流性食管炎的干预作用及机制[D]. 武汉: 湖北中医药大学博士学位论文, 2022.  
HUANG YQ. Based on the esophageal flora, this paper discusses the intervention effect and mechanism of Qingyu Hejiang Decoction on reflux esophagitis[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Hubei University of Chinese Medicine, 2022 (in Chinese).
- [12] 陈冬梅, 赵兴杰, 丁庞华, 郭一. 肠道菌群与中药及其有效组分相互作用治疗消化系统疾病的研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22(3): 755-760.  
CHEN DM, ZHAO XJ, DING PH, GUO Y. Study advances on treatment of digestive diseases by interaction of gut microbiota and traditional Chinese medicine with effective ingredients[J]. *Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology*, 2020, 22(3): 755-760 (in Chinese).
- [13] 段欣慧. 通降合剂治疗肝胃郁热型反流性食管炎的疗效评价及基于“脑-肠”轴作用机制探讨[D]. 南京: 南京中医药大学硕士学位论文, 2019.  
DUAN XH. Curative effect evaluation of Tongjiang mixture on reflux esophagitis of liver and stomach stagnation heat type and discussion on its mechanism based on “brain-intestine” axis[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing University of Chinese Medicine, 2019 (in Chinese).

- [14] 苏坤涵. 通降合剂治疗肝胃郁热型反流性食管炎的疗效评价及其对肠道菌群的影响[D]. 南京: 南京中医药大学硕士学位论文, 2019.
- SU KH. Curative effect evaluation of Tongjiang mixture on reflux esophagitis of liver-stomach stagnation heat type and its influence on intestinal flora[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing University of Chinese Medicine, 2019 (in Chinese).
- [15] 尹红, 唐艳萍, 杨磊, 刘思雨. 活血通降方对反流性食管炎大鼠肠道菌群及 Caspase-3/GSDME 通路的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2022, 30(10): 701-707, 712.
- YIN H, TANG YP, YANG L, LIU SY. Effects of Huoxue Tongjiang prescription on intestinal flora and cysteine protease 3/gasdermin E pathway in rats with reflux esophagitis[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Digestion, 2022, 30(10): 701-707, 712 (in Chinese).
- [16] de VADDER F, GRASSET E, MANNERÅS HOLM L, KARSENTY G, MACPHERSON AJ, OLOFSSON LE, BÄCKHED F. Gut microbiota regulates maturation of the adult enteric nervous system via enteric serotonin networks[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(25): 6458-6463.
- [17] 谭怡青, 周丹娜, 袁芳艳, 刘泽文, 杨克礼, 刘威, 郭锐, 李畅, 黎璐, 田永祥, 高婷. 链球菌的危害及天然化合物抗链球菌作用的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2023(5): 22-26.
- TAN YQ, ZHOU DN, YUAN FY, LIU ZW, YANG KL, LIU W, GUO R, LI C, LI L, TIAN YX, GAO T. Research progress on the harm of *Streptococcus* and the anti-*Streptococcus* effects of natural compounds[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2023(5): 22-26 (in Chinese).
- [18] 王晨. 肠道拟杆菌种结构组成对溃疡性结肠炎发展的影响[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2021.
- WANG C. Effect of *Bacteroides* intestinal species structure on the development of ulcerative colitis[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2021 (in Chinese).
- [19] YANG JP, LI YN, WEN ZQ, LIU WZ, MENG LT, HUANG H. *Oscillospira*-a candidate for the next-generation probiotics[J]. Gut Microbes, 2021, 13(1): 1987783.
- [20] 于钊瑞, 赵鑫, 邱峰. 双歧杆菌、乳杆菌和芽孢杆菌产细菌素和多糖研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(24): 396-406.
- YU ZR, ZHAO X, QIU F. Bacteriocins and polysaccharides from *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and *Bacillus*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(24): 396-406 (in Chinese).
- [21] 李小兰, 江敏, 阮征, 杨玉辉, 周艳, 印遇龙. 色氨酸及其代谢产物 5-HT 对肠道功能的作用综述[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(7): 1997-2002.
- LI XL, JIANG M, RUAN Z, YANG YH, ZHOU Y, YIN YL. Review of effects of L-tryptophan and its metabolite 5-hydroxytryptamine on intestinal function[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2014, 5(7): 1997-2002 (in Chinese).
- [22] MAKI JJ, LOOFT T. *Turicibacter bilis* sp. nov., a novel bacterium isolated from the chicken eggshell and swine ileum[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2022, 72(1): 005153.
- [23] Wang K, Liao MF, Zhou N, Bao L, Ma K, Zheng ZY, Wang YJ, Liu C, Wang WZ, Wang J, Liu SJ, Liu HW. *Parabacteroides distasonis* alleviates obesity and metabolic dysfunctions via production of succinate and secondary bile acids[J]. Cell Reports, 2019, 26(1): 222-235.e5.