

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.22.011

19 例不同中医证型溃疡性结肠炎患者肠道菌群的差异性

柯一帆, 马芳笑, 钟继红, 胡裕耀, 徐磊, 刘英超*

(浙江中医药大学第二临床医学院, 杭州市滨江区滨文路 548 号, 310053)

摘要 目的 探讨不同中医证型溃疡性结肠炎 (UC) 患者肠道菌群的差异。方法 收集 19 例 UC 患者粪便样本, 患者辨证分为脾虚湿热证组 8 例、寒热错杂证组 5 例、肝郁脾虚证组 4 例、脾肾阳虚证组 2 例, 采用 16SrDNA 测序技术, 对各组肠道菌群及菌群代谢情况进行统计学分析。结果 各组样本共包含 15 个已知的门、182 个菌属。在所有样本中, 优势菌门为厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 及变形菌门 (Proteobacteria), 分别在脾虚湿热证组中依次占 51.71%、34.09% 和 11.97%; 在寒热错杂证组中依次占 46.50%、34.49% 和 10.50%; 在肝郁脾虚证组中依次占 60.57%、34.04%、3.31%; 在脾肾阳虚证组中依次占 38.58%、50.61%、9.76%。75 个菌属在各组中均出现, 脾虚湿热证组特有菌属数为 23 个, 寒热错杂证组特有菌属数为 10 个, 肝郁脾虚证组特有菌属数为 13 个, 脾肾阳虚证组特有菌属数为 1 个。各组患者的肠道菌群中短杆菌属 (Brevibacterium)、副拟杆菌属 (Parabacteroides)、热单胞菌属 (Thermomonas) 和斯卡多维氏菌 (Scardovia) 4 个菌属差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中副拟杆菌属在肝郁脾虚证组含量最低 (0.06%)。肠道菌群代谢途径观察发现, 寒热错杂证组在 2 个差异有统计学意义的代谢途径中类胡萝卜素生物合成、蛋白酶体代谢均有较高的表达 ($P < 0.05$)。结论 不同中医证型的 UC 患者肠道菌群的构成及菌群代谢特征差异明显, 其中副拟杆菌属含量下降与肝郁脾虚证相关性高, 有潜力成为诊断肝郁脾虚证 UC 的诊断性生物标记物。

关键词 溃疡性结肠炎; 脾虚湿热; 寒热错杂; 肝郁脾虚; 脾肾阳虚; 肠道菌群; 16SrDNA 高通量测序

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是以免疫紊乱为主要发病机制的慢性非特异性炎症肠病, 主要临床表现为腹痛、黏液脓血便等。21 世纪以来, 该病在欧美发病率已经超过了 0.3%, 亚洲、非洲和南美洲的部分新兴工业化国家的发病率逐年上升^[1]。目前普遍认为, 遗传易感性、环境因素变化及微生物群失衡是 UC 发病的主要因素^[2-4], 但具体发病原因仍旧不明确。

中医学认为, 脾虚为 UC 发病之本, 湿阻为标。湿邪壅滞气血, 化热化腐成疡, 日久则脾气虚弱或脾肾阳虚。前期本小组成员利用传统培养方法及 PCR-DGGE 技术研究发现, UC 患者的肠道菌群多样性较低, 且双歧杆菌、乳酸杆菌的数量较健康人群明显减少, 表明肠道微生态失调与 UC 的发

生发展具有一定相关性。为进一步研究不同中医证型 UC 患者肠道菌群的差异性, 本研究收集 19 例 UC 患者粪便样本, 采用 16SrDNA 测序技术, 研究 UC 患者不同中医证型间肠道菌群结构特征及差异, 初步筛选“病”与“证”相关的微生态特征, 从肠道微生态角度探讨中医证候与现代医学检测指标之间的相关性。

1 临床资料

1.1 诊断标准

西医诊断标准参照《中国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见》^[5]。

中医辨证标准参照《中药新药临床研究指导原则 (试行)》^[6] 及《溃疡性结肠炎中医诊疗共识意见》^[7] 拟定。脾虚湿热证, 主症: 1) 腹泻, 便下黏液脓血; 2) 腹痛; 3) 里急后重。次症: 1) 肛门灼热感; 2) 腹胀; 3) 神疲乏力; 4) 面色少华。舌脉: 舌红有齿痕, 苔黄腻; 脉细。寒热错杂

基金项目: 浙江省自然科学基金 (LY14H290005); 浙江省中医药科技计划 (2014ZA054)

* 通讯作者: jcsylc@163.com, 13906536623

证,主症:1)下痢稀薄,夹有黏冻,反复发作;2)肛门灼热;3)腹痛绵绵。次症:1)畏寒怕冷;2)口渴不欲饮;3)饥不欲食。舌脉:舌质红,或舌淡红,苔薄黄;脉弦,或细弦。肝郁脾虚证,主症:1)情绪抑郁或焦虑不安,常因情志因素诱发大便次数增多;2)大便稀溏或黏液便;3)腹痛即泻,泻后痛减。次症:1)排便不爽;2)饮食减少;3)腹胀;4)肠鸣。舌脉:舌质淡红,苔薄白;脉弦或弦细。脾肾阳虚证,主症:1)久泻不止,大便稀薄;2)夹有白冻,或伴有完谷不化,甚则滑脱不禁;3)腹痛喜温喜按。次症:1)腹胀;2)食少纳差;3)形寒肢冷;4)腰酸膝软。舌脉:舌质淡胖,或有齿痕,苔薄白润;脉沉细。具体分型标准如下:主症中2项,第1)项必备,次症2项;或主症第1)项,次症3项,并参考舌脉。

1.2 纳入标准

1)符合上述西医诊断标准及中医辨证标准;2)分型为轻、中型^[6];3)年龄30~60岁;4)签署知情同意书。

1.3 排除标准

1)合并继发性或原发性心血管、脑、肺、肝、肾、骨髓等靶器官的致命性损害者;2)入组前1个月内服用过抗生素及益生菌制剂者;3)妊娠期、哺乳期妇女及精神病患者;4)过敏体质及多种药物过敏史者。

1.4 一般资料

研究对象来自2015年1—8月浙江中医药大学附属第二医院、浙江省中医院、浙江大学附属第二医院及浙江省人民医院门诊就诊及住院的UC患者19例,统一由浙江中医药大学附属第二医院的1名副主任医师进行中医辨证:脾虚湿热证组患者8例,其中男4例,女4例,年龄52.0(37.8,66.8)岁,病程2.0(0.6,3.0)年;寒热错杂证组患者5例,其中男2例,女3例,年龄54.0(39.0,62.5)岁,病程2.0(0.4,4.0)年;肝郁脾虚证组患者4例,其中男1例,女3例,年龄49.0(38.6,61.5)岁,病程2.3(2.0,4.4)年;脾肾阳虚证组患者2例,其中男1例,女1例,年龄36岁和38岁,病程1年和0.3年。各组患者年龄、性别及病程组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究通过浙江中医药大学附属第二医院的伦理委员会审查(批准号:2014科研审29号)。

2 方法

2.1 粪便采集及DNA提取

采集所有入选者自然排出的新鲜粪便(2g以上),迅速将粪便装于无菌样品管中,样品管冰浴1h内运送至浙江中医药大学实验室,在无菌条件下进行分装,液氮冷却后置于-80℃超低温冰箱中保存。粪便样品DNA的提取主要参照粪便基因组DNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司,批号R7010)说明进行。

2.2 DNA的PCR扩增及纯化

通过PCR扩增16S rRNA基因V3-V4可变区,所采用的引物是338上游引物:5'-CCTACGGGNG-GCWGCAG3'扩增片段468bp和806下游引物:5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC3'扩增片段468bp,扩增条件为:95℃解链3min,95℃30s,55℃30s,72℃45s,25个循环,72℃延伸5min。PCR扩增反应体系25μl,包括:2×Phanta Max Master Mix(Vazyme)12.5μl,正向引物0.5μl,反向引物0.5μl,DNA模板2μl及无酶水9.5μl。然后将PCR产物经2.0%的琼脂糖凝胶在120V电压下持续电泳20min,再使用凝胶成像系统(上海培清科技有限公司,JS-6800型)进行紫外成像拍照,对其进行质检。向质检合格的PCR产物中加入混匀的等体积DNA纯化磁珠,吹打混匀后室温静置3~5min,再将样本置于磁力架上,静置3min后去除上清液。向上清液中加入200μl 80%乙醇静置30s后去除乙醇,重复上一步,完全去除乙醇后室温晾干,接着加入24μl无酶水吹打混匀洗脱产物,磁力架外静置3min,再置于磁力架上3min后吸取22μl上清至新管中,完成纯化。

2.3 DNA标记

PCR标记体系25μl,包括:2×Phanta Max Master Mix(Vazyme)(南京诺唯赞生物科技有限公司,批号:7E361A9)12.5μl,Index Primer 1(N7xx)(Invitrogen,批号:HG1908159007)0.5μl,Index Primer 2(N5xx)(Invitrogen,批号:HS1812259021)0.5μl,扩增纯化后的DNA2μl,无酶水9.5μl。标记条件为:95℃解链3min,95℃30s,55℃30s,72℃45s,8个循环,72℃延伸5min。完成后再次进行质检及纯化。

2.4 文库构建及上机测序

将标记纯化后各样本DNA根据其浓度按相同总量混合到一管中并稀释至4nmol/L,取5μl浓度

为 4 nmol/L 文库与 5 μ l 浓度为 0.2 mol/L 的 NaOH 混匀, 室温孵育 5 min, 使双链文库变性为单链文库, 在 10 μ l 变性文库中加入 990 μ l 完全解冻的杂交缓冲液, 使得终浓度为 20 pmol/L。文库 Pooling 具体流程参考 Qubit 操作流程。将 Miseq 2x300 V3 试剂盒 (Illumina, 批号: 20733133) 置于水中完全解冻 60 min, 测序芯片 Flow Cell (Illumina, 批号: 20367170) 放置室温后用超纯水冲洗干净表面盐分并擦拭干净, 将 Phix 以 25% 的比例与稀释好的文库混合, 总体积为 600 μ l, 使用 1 ml 洁净枪头刺破试剂盒上 Load Sample 铝箔封口, 将稀释好的混合文库全部加入到孔内后运行 Miseq 测序程序。

2.5 生物信息学分析和统计学方法

使用 vsearch 2.8.1 对优质序列以相似度 0.97 进行聚类, 选取每个操纵分类单元中丰度最高的序列为代表序列, 将代表序列用 RDP-classifier 2.11 软件对序列进行物种注释 (精确到“属”)。同时采用 Qiime 流程去掉所有样品中只含有一条序列的操纵分类单元, 以保证结果的准确性。采用 SPSS 22.0 处理数据, 计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 K-W 非秩和检验或 wilcoxon 检验进行统计学分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。使用 R 语言进行绘图。

3 结果

3.1 各组菌群门水平比较

各组样本共包含来自古菌界及细菌界的 15 个已知的门: 厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门、放线菌门 (Actinobacteria)、梭杆菌门 (Fusobacteria)、疣微菌门 (Verrucomicrobia)、螺旋体菌门 (Candidatus Saccharibacteria)、蓝藻门 (Cyanobacteria)、黏胶球形菌门 (Lentisphaerae)、广古菌门 (Euryarchaeota)、互养菌门 (Synergistetes)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、浮霉菌门 (Planctomycetes)、Cloacimonetes、绿弯菌门 (Chloroflexi)。在所有样本中, 丰度最高的 3 个菌门为厚壁菌门、拟杆菌门及变形菌门, 分别在脾虚湿热证组中依次占 51.71%、34.09% 和 11.97%; 在寒热错杂证组中依次占 46.50%、34.49% 和 10.50%; 在肝郁脾虚证组中依次占 60.57%、34.04%、3.31%; 在脾肾阳虚证组中依次占 38.58%、50.61%、9.76%。在门水平上, 所有样本均表现出明显的个体差异: 厚壁菌门在样本中占比从最高的 89.41% 到最低的 24.97%, 拟杆菌门占比从最高的 61.66% 到最低的 0.08%, 变形菌门占比从最高的 42.53% 到最低

的 1.28%。但从门水平观察, 各组间差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$)。

3.2 各组菌群属水平比较

各组共观察到来自 15 个已知菌门的 182 个菌属。不同组间菌属的共有/特有情况以 Venn 图表示。通过 Venn 图我们可以发现, 其中 75 个菌属在各组中均出现, 脾虚湿热证组特有菌属为 23 个, 寒热错杂证组特有菌属为 10 个, 肝郁脾虚证组特有菌属为 13 个, 脾肾阳虚证组特有菌属为 1 个。

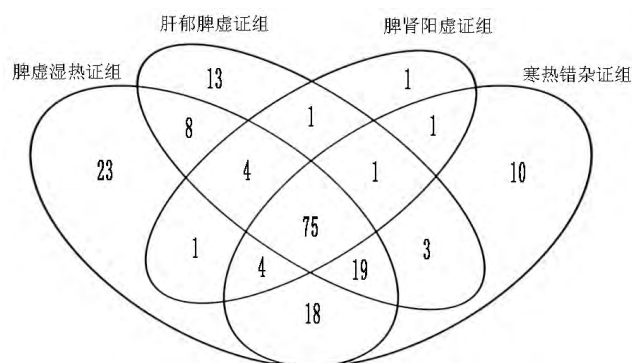


图1 各组溃疡性结肠炎患者肠道菌群属水平 Venn 图

脾虚湿热证组中观察到 152 个菌属, 其中占比 $> 1\%$ 的菌属共 14 个, 分别为: 拟杆菌门的拟杆菌属 (Bacteroides) (30.58%); 厚壁菌门栖粪杆菌属 (Faecalibacterium) (19.17%)、罗斯拜瑞氏菌属 (Roseburia) (6.69%)、毛螺旋菌科未定属 1 (Lachnospiraceae incertae sedis) (4.25%)、毛螺旋菌科的未定属 2 (f_Lachnospiraceae) (3.71%)、瘤胃球菌科的未定属 (f_Ruminococcaceae) (2.77%)、乳酸杆菌属 (Lactobacillus) (2.09%)、XIVa 型梭菌 (Clostridium XIVa) (2.02%)、布劳特氏菌属 (Blautia) (1.35%)、巨单胞菌属 (Megamonas) (1.25%)、韦荣氏球菌属 (Veillonella) (1.02%); 变形菌门的埃希氏菌属 (Escherichia) (4.22%)、克雷伯氏菌属 (Klebsiella) (3.74%); 放线菌门的双歧杆菌属 (Bifidobacterium) (1.48%)。

寒热错杂证组中观察到 131 个菌属, 其中占比 $> 1\%$ 的菌属共 17 个, 分别为: 拟杆菌门拟杆菌属 (33.88%)、副拟杆菌属 (1.12%); 厚壁菌门的瘤胃球菌科的未定属 (7.15%)、毛螺旋菌科未定属 1 (6.34%)、栖粪杆菌属 (6.04%)、毛螺旋菌科的未定属 2 (3.68%)、XIVa 型梭菌 (3.30%)、狭义梭菌属 (Clostridium sensu stricto) (2.88%)、罗斯拜瑞氏菌属 (2.77%)、戴阿利斯特菌属 (Dialister) (2.14%)、瘤胃球菌属 (Ru-

minococcus) (1.62%)、韦荣氏球菌属 (1.57%)、丹毒丝菌科未定属 (*Erysipelotrichaceae incertae sedis*) (1.02%)、XVIII 型梭菌 (*Clostridium XVIII*) (1.02%); 变形菌门的埃希氏菌属 (6.61%)、伯克霍尔德氏目的未定属 (*o_Burkholderiales*) (1.40%); 放线菌门的双歧杆菌属 (5.43%)。

肝郁脾虚证组中观察到 124 个菌属, 其中占比 >1% 的菌属共 13 个, 分别为: 拟杆菌门拟杆菌属 (25.37%)、普雷沃氏菌属 (*Prevotella*) (8.02%); 厚壁菌门的韦荣氏球菌属 (19.21%)、栖粪杆菌属 (8.40%)、罗斯拜瑞氏菌 (7.30%)、厌氧棒状菌属 (*Anaerostipes*) (6.61%)、毛螺旋菌科的未定属 2 (2.73%)、链球菌属 (*Streptococcus*) (1.94%)、瘤胃球菌科的未定属 (1.40%)、戴阿利斯特菌属 (1.32%)、毛螺旋菌科未定属 2 (1.30%)、粪球菌属 (*Coprococcus*) (1.16%)、变形菌门的嗜血杆菌属 (*Haemophilus*) (1.37%)。

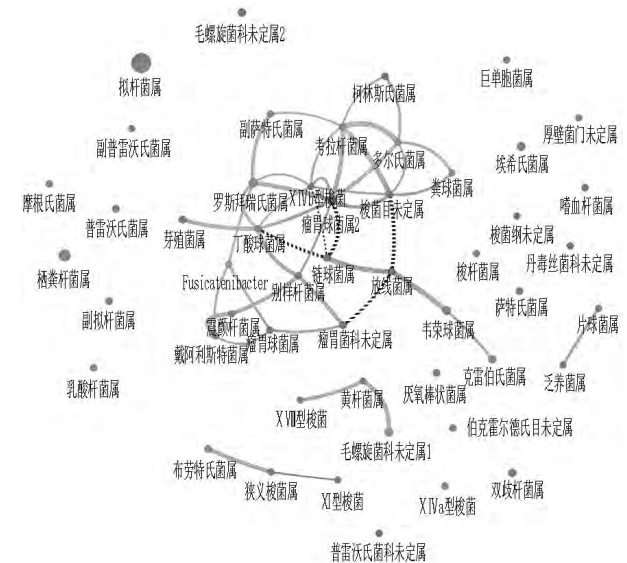
脾肾阳虚证组中观察到 88 个菌属, 其中占比 >1% 的菌属共 13 个, 分别为: 拟杆菌门拟杆菌属 (46.27%)、副拟杆菌属 (4.10%); 厚壁菌门栖粪杆菌属 (9.76%)、毛螺旋菌科未定属 1 (6.17%)、毛螺旋菌科的未定属 2 (4.06%)、罗斯拜瑞氏菌属 (3.48%)、布劳特氏菌属 (3.34%)、XIVa 型梭菌 (1.84%)、芽殖菌属 (*Gemmiger*) (1.61%)、XVIII 型梭菌 (1.26%); 变形菌门的克雷伯氏菌属 (5.09%)、埃希氏菌属 (2.24%)、副萨特氏菌属 (*Parasutterella*) (1.05%)。

通过 K-W 检验分析表明, 各组间以下 4 个菌属差异均有统计学意义 ($P < 0.05$): 放线菌门短杆菌属 ($P = 0.009$), 拟杆菌门副拟杆菌属 ($P = 0.030$), 变形菌门热单胞菌属 ($P = 0.037$) 和放线菌门斯卡多维氏菌 ($P = 0.048$)。其中副拟杆菌属在各组中均被检测到, 含量从高到低依次为: 脾肾阳虚证组 (4.10%)、寒热错杂证组 (1.12%)、脾虚湿热证组 (0.81%)、肝郁脾虚证组 (0.06%)。短杆菌属仅在肝郁脾虚证组与脾肾阳虚证组中以 <0.01% 的低丰度检测到。热单胞菌属仅在脾肾阳虚证组中以 <0.01% 的低丰度检测到。斯卡多维氏菌仅在肝郁脾虚证组中以 <0.01% 的低丰度检测到。

3.3 各组菌群相关性分析

本研究通过分析平均丰度最高的 50 个菌属在不同样品的丰度变化一致性情况, 来推测两个样品

物种之间的作用关系, 结果以相关性 network 图展示, 见图 2。从图中可以发现, 各组中丰度大于 1% 菌属中, 伯克霍尔德氏目的未定属、拟杆菌属、栖粪杆菌属、埃希氏菌属、副拟杆菌属、毛螺旋菌科未定属 2、普雷沃氏菌属、巨单胞菌属、嗜血杆菌属、丹毒丝菌科未定属、厌氧棒状菌属、双歧杆菌、XIVa 型梭菌、乳酸杆菌属 14 个菌属未与其他菌属有明显相关性; XVIII 型梭菌、黄杆菌属 (*Flavonifractor*) 及毛螺旋菌科未定属 13 个菌属间存在正相关; 布劳特氏菌属、狭义梭菌属及 XI 型梭菌 (*Clostridium XI*) 3 个菌属间存在正相关; 瘤胃球菌科未定属、瘤胃球菌属、芽殖菌属、罗斯拜瑞氏菌属、粪球菌属、戴阿利斯特菌属及副萨特氏菌属 7 个菌属通过菌属相互作用呈正相关; 链球菌属、韦荣氏球菌属与克雷伯氏菌属呈正相关。



注: 网的结点表示一个物种, 结点大小来表示物种丰度大小, 两个节点之间的连线表示这两个物种有联系, 连线粗细表示关联性强弱 (实线表示正相关, 虚线表示负相关)。

图 2 各组溃疡性结肠炎患者肠道菌群相关性 network 图

3.4 各组肠型分析

图 3 示, 各组中医证型存在较为显著的组间差异, 其中脾肾阳虚证组与脾虚湿热证组的样本点较集中, 组间差异较小; 其余各组间样本点较分散, 组间差异较大。

副拟杆菌属的富集与脾肾阳虚证组及脾虚湿热证组的相关性较强, 该两组肠型属于副拟杆菌型; 普雷沃氏菌属的富集与肝郁脾虚证组相关性较强, 肝郁脾虚证组的肠型为 ETP-普雷沃氏菌型; 瘤胃球菌科未定属的富集与寒热错杂证组相关性较强,

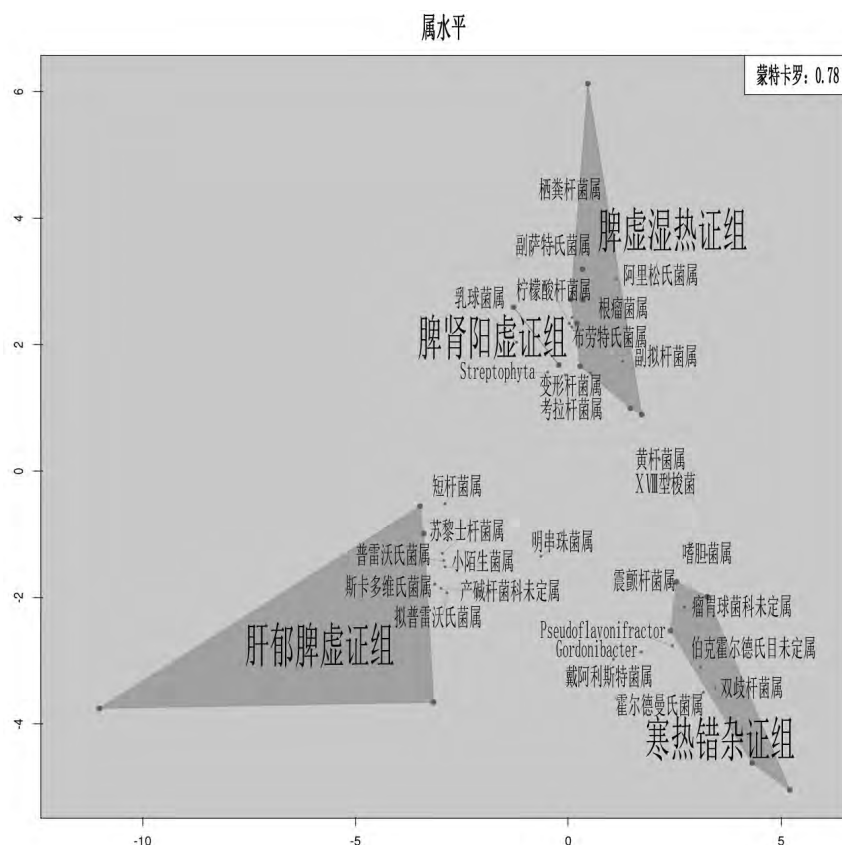


图 3 4 组肠型分布图

寒热错杂证组肠型为 ETF-厚壁菌型 (以瘤胃球菌为主)。

3.5 各组肠道菌群代谢途径比较

将 16S rDNA 所对应物种基因与来自 KEGG 的基因组数据库组合, 共发现 278 个相关代谢途径。本研究对相关代谢途径进行了数据整合, 并使用 K-W 检验对比了各组相关代谢途径, 发现其中 2 个代谢途径差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 分别为类胡萝卜素生物合成途径 ($P = 0.027$) 及蛋白酶体代谢途径 ($P = 0.034$)。其中类胡萝卜素生物合成在寒热错杂证组中最为旺盛, 在脾虚湿热证组中最低; 蛋白酶体代谢在寒热错杂证组中最为旺盛, 在脾肾阳虚证组中最低。

4 讨论

有研究报道, 相较于正常人群, 溃疡性结肠炎患者肠道菌群多样性明显下降, 同时紊乱的肠道菌群会破坏肠道黏膜屏障, 增加肠道通透性^[8], 且能通过调节 T 细胞直接介导肠道炎症发生^[9-10]。而部分特殊菌群如双歧杆菌^[11]、弯曲杆菌 (Campylobacter)^[12]、粘附侵袭性大肠杆菌 (Adherent-invasive escherichia coli)^[13] 等被认为是 UC 致病的标志性菌群。另有研究者报道, 通过连

续监测患者肠道菌群变化, 来对 UC 病情的严重程度进行分析^[14], 对预测 UC 的缓解, 判定治疗是否起效非常有价值^[15]。综上所述, 肠道的微生物群失衡是 UC 发病的重要机制。

本研究比较分析了 4 个中医证型的 UC 患者肠道菌群的构成及菌群代谢的差异。各组样本肠道菌群在门水平上比较差异无统计学意义, 表明各组患者虽归属于不同中医证型, 但肠道菌群相对一致, 因此, 不同中医证型 UC 患者的肠道菌群在门水平上不具有区分中医证型的意义。在菌属水平, 不同中医证型的 UC 患者的肠道菌群差异较大。肠型分析是在主成分分析基础上, 针对菌属差异比较进行了改进, 能够将组别与物种贡献成分相关联^[14]。肠型概念最早于 2011 年由 Arumugam 等人提出, 其团队分析了来自不同人群样本的肠道菌群测序结果后, 发现这些样本可以根据不同菌属富集的程度分为 3 个肠型: 肠型 1 (ET B) 以拟杆菌属为指示菌种; 肠型 2 (ET P) 以普雷沃氏菌属为指示菌种; 肠型 3 (ET F) 以厚壁菌门的瘤胃球菌属为指示菌种^[14]。进一步研究显示, 不同肠型与肥胖、炎症性肠病及 2 型糖尿病等多种疾病易感性有关^[17]。肠型分析显示, 脾虚湿热证、寒热错杂证

及肝郁脾虚证患者的肠道菌群结构间存在较明显的组间差异,进一步统计学分析发现 4 种中医证型患者的肠道菌群在短杆菌属、副拟杆菌属、热单胞菌属和斯卡多维氏菌等 4 个菌属中差异有统计学意义;其中副拟杆菌属的丰度在肝郁脾虚证 UC 患者中最低,同时相关性 network 图显示其丰度未受其他菌属影响,因此我们认为其有潜力成为肝郁脾虚证 UC 的诊断性生物标记物。

副拟杆菌属是人体肠道的核心菌群之一,多项研究^[8-20]显示,在部分自身免疫性疾病患者、抑郁症患者及肥胖患者的肠道菌群中,副拟杆菌属的丰度均出现明显下降。副拟杆菌属可以产生 γ -氨基丁酸,进而通过脑肠轴调节中枢神经而改善抑郁症状^[21]。同时,副拟杆菌属有产生琥珀酸的能力,琥珀酸作为糖异生葡萄糖前体,通过激活果糖 1,6-二磷酸酶而上调糖异生途径表达,从而调节食欲,促进肝脏糖原合成^[22]。因此,副拟杆菌属丰度的降低与情志变化发生的糖代谢紊乱密切相关。

中医理论的“肝郁”与抑郁症关联十分密切,抑郁症的临床表现与肝郁引起的情志不畅较为相似。脾为气血化生之原。脾化生和运输的精微物质中最重要的物质之一是葡萄糖^[23]。研究^[24]发现,脾虚证患者存在糖耐量下降。肝脾两个系统病理上相互影响的核心科学内涵是:情志-能量网络的失衡^[25]。根据本研究的结果我们推测,情志-能量网络失衡的关键环节之一可能是肠道菌群失调,如副拟杆菌属的丰度下降,导致患者肠道菌群代谢产物发生变化,引起糖代谢异常,进而产生了肝郁脾虚证。

另外,在肠道菌群的代谢产物测定中可以发现,类胡萝卜素生物合成在寒热错杂证组中最为旺盛,在脾虚湿热证组中最低;蛋白酶体代谢在寒热错杂证组中最为旺盛,在脾肾阳虚证组中最低,表明了各证型 UC 的致病机理可能存在差异,为今后研究对不同证型患者的针对性治疗提供了方向。但由于本研究样本量较少,影响肠道菌群的因素较多等,还需大样本多中心研究进一步证实。

参考文献

- [1] NG SC, SHI HY, HAMIDI N, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies [J]. *Lancet*, 2018, 390(10114): 2769-2778.
- [2] MOLLER FT, ANDERSEN V, WOHLFAHRT J, et al. Familial risk of inflammatory bowel disease: a population-based cohort study 1977-2011 [J]. *Am J Gastroenterol*, 2015, 110(4): 564-571.
- [3] SHOUVAL DS, RUFO PA. The role of environmental factors in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases: a review [J]. *JAMA Pediatr*, 2017, 171(10): 999-1005.
- [4] MANICHANH C, BORRUEL N, CASELLAS F, et al. The gut microbiota in IBD [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012, 9(10): 599-608.
- [5] 中华医学会消化病学分会炎症性肠病协作组. 中国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见 [J]. *中华内科杂志*, 2008, 47(1): 73-79.
- [6] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 129-134.
- [7] 张声生. 溃疡性结肠炎中医诊疗共识意见 [J]. *中华中医药杂志*, 2010, 25(6): 891-895.
- [8] ALVAREZ CS, BADIA J, BOSCH M, et al. Outer membrane vesicles and soluble factors released by probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 and commensal ECOR63 enhance barrier function by regulating expression of tight junction proteins in intestinal epithelial cells [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 1981. doi: 10.3389/fmicb.2016.01981.
- [9] HANSEN JJ. Immune responses to intestinal microbes in inflammatory bowel diseases [J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2015, 15(10): 61.
- [10] SARRABAYROUSE G, BOSSARD C, CHAUVIN JM, et al. CD4CD8 $\alpha\alpha$ lymphocytes, a novel human regulatory T cell subset induced by colonic bacteria and deficient in patients with inflammatory bowel disease [J]. *PLoS Biol*, 2014, 12(4): e1001833.
- [11] DURANTI S, GAIANI F, MANCABELLI L, et al. Elucidating the gut microbiome of ulcerative colitis: bifidobacteria as novel microbial biomarkers [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2016, 92(12): fiw191. doi: 10.1093/femsec/fiw191.
- [12] KAAKOUSH NO, MITCHELL HM, MAN SM. Role of emerging campylobacter species in inflammatory bowel diseases [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2014, 20(11): 2189-2197.
- [13] PALMELA C, CHEVARIN C, XU Z, et al. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease [J]. *Gut*, 2018, 67(3): 574-587.
- [14] MAR JS, LAMERE BJ, LIN DL, et al. Disease severity and immune activity relate to distinct interkingdom gut microbiome states in ethnically distinct ulcerative colitis patients [J]. *MBio*, 2016, 7(4): e01072-16. doi: 10.1128/mBio.01072-16.
- [15] SHAW KA, BERTHA M, HOFMEKLER T, et al. Dysbiosis, inflammation, and response to treatment: a longitu-

- dinal study of pediatric subjects with newly diagnosed inflammatory bowel disease [J]. *Genome Med*, 2016, 8(1): 75.
- [6] ARUMUGAM M, RAES J, PELLETIER E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome [J]. *Nature*, 2011, 473(7346): 174-180.
- [7] COSTEA PI, HILDEBRAND F, ARUMUGAM M, et al. Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition [J]. *Nat Microbiol*, 2018, 3(1): 8-16.
- [8] CEKANAVICIUTE E, YOO BB, RUNIA TF, et al. Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(40): 10713-10718.
- [9] DEL CHIERICO F, NOBILI V, VERNOCCHI P, et al. Gut microbiota profiling of pediatric nonalcoholic fatty liver disease and obese patients unveiled by an integrated meta-omics-based approach [J]. *Hepatology*, 2017, 65(2): 451-464.
- [20] VERDAM FJ, FUENTES S, DE JONGE C, et al. Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity [J]. *Obesity*, 2013, 21(12): E607-E615. doi: 10.1002/oby.20466.
- [21] STRANDWITZ P, KIM KH, TEREKHOVA D, et al. GABA-modulating bacteria of the human gut microbiota [J]. *Nat Microbiol*, 2019, 4(3): 396-403.
- [22] WANG K, LIAO M, ZHOU N, et al. Parabacteroides distasonis alleviates obesity and metabolic dysfunctions via production of succinate and secondary bile acids [J]. *Cell Reports*, 2019, 26(1): 222-235.
- [23] 刘毅, 冯晓桃, 王文健. “脾主运化”理论再认识 “脾主运”与“脾主化”之辨析 [J]. *中医杂志*, 2011, 52(15): 1264-1266.
- [24] 孙建功, 刘孝梅, 白永清. 糖耐量低减患者血脂水平与中医辨证分型关系探究 [J]. *中医临床研究*, 2011, 3(8): 96-97.
- [25] 李晓娟, 马庆宇, 邱文琪, 等. 抑郁症葡萄糖代谢失衡机制及其中医药研究的思考 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2018, 20(6): 44-50.

Study on the Difference of Intestinal Flora in 19 Patients with Ulcerative Colitis of Different Traditional Chinese Medicine Syndromes

KE Yifan, MA Fangxiao, ZHONG Jihong, HU Yuyao, XU Lei, LIU Yingchao

(Second Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou, 310053)

ABSTRACT Objective To investigate the differences of intestinal flora in patients with ulcerative colitis (UC) of different traditional Chinese medicine (TCM) syndromes. **Methods** Stool samples from 19 UC patients were collected. After syndrome differentiation, patients were divided into a spleen-deficiency damp-heat syndrome group of 8 cases, a cold-heat mixing syndrome group of 5 cases, a liver stagnation and spleen deficiency syndrome group of 4 cases, and a spleen and kidney yang deficiency syndrome group of 2 cases. Each group used 16SrDNA sequencing technology to conduct statistical analysis of the metabolism of intestinal flora and flora in each group. **Results** Each group of samples contained 15 known phylums and 182 genera. In all the samples, the dominant bacteria phylums were Firmicutes, Bacteroides and Proteobacteria, which accounted for 51.71%, 34.09%, 11.97% respectively in the spleen-deficiency and damp-heat syndrome group, and 46.50%, 34.49%, 10.50% in the cold-heat mixing syndrome group, 60.57%, 34.04%, 3.31% in the liver stagnation and spleen deficiency syndrome group, and 38.58%, 50.61%, 9.76% in the spleen and kidney yang deficiency syndrome group. There were 75 genus appeared in all groups. There were 23 specific genera in the spleen-deficiency damp-heat syndrome group, 10 specific genera in the cold-heat mixing syndrome group, 13 specific genera in the liver stagnation and spleen deficiency syndrome group and 1 specific genera in the spleen and kidney yang deficiency syndrome group. There were significant differences among the 4 groups of bacteria genus in the intestinal flora of each group. There were statistical difference in *Brevibacterium*, *Parabacillus*, *Thermomonas* and *Skatoga* in intestinal flora of different type of UC patients ($P < 0.05$), among them, *Parabacillus* had the lowest content in the liver stagnation and spleen deficiency syndrome group (0.06%). For the intestinal flora metabolic pathway, it was found that the cold-heat mixing syndrome group had higher expression of carotenoid biosynthesis and proteasome metabolism in 2 statistically significant metabolic pathways ($P < 0.05$). **Conclusion** The composition of intestinal flora and the metabolic characteristics of in UC patients with different TCM syndrome types are obviously different. The decrease of the content of Parasitic genus is highly related to the syndrome of liver stagnation and spleen deficiency. It might be the potential diagnostic biomarkers for diagnosis of UC patients with liver stagnation and spleen deficiency syndrome.

Keywords ulcerative colitis; spleen-deficiency damp-heat syndrome; cold-heat mixing syndrome; liver stagnation and spleen deficiency syndrome; spleen and kidney yang deficiency syndrome; intestinal flora; 16SrDNA high-throughput sequencing

(收稿日期: 2019-01-11; 修回日期: 2019-08-18)

编辑: 王利芬