

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.14.016

实验研究

脾虚模型大鼠肠道菌群分布及时效性研究

郑昊龙^{1,2}, 陈丝¹, 宋囡^{1,3}, 曹慧敏^{1,3}, 吴瑶¹, 王杰¹, 贾连群^{1,3*}

1. 辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室, 辽宁省沈阳市皇姑区崇山东路 79 号, 110847; 2. 北部战区总医院; 3. 辽宁中医药大学中医药创新工程技术中心

摘要 目的 应用肠道微生物 16S rDNA 测序技术探讨脾虚对肠道微生物的影响及时效性。方法 将 48 只大鼠随机分为对照组和脾虚组, 每组又分为 2、10、16 周 3 个时间点, 每组每个时间点 8 只大鼠, 雌雄各半。脾虚组采用饮食不节加力竭游泳法建立脾虚模型。分别于 0、2、10、16 周时检测雌雄大鼠体重, 于 2、10、16 周时检测大鼠尿 D-木糖排泄率、血清淀粉酶活力。采用肠道菌群 Beta 多样性分析、Alpha 多样性分析比较对照组和脾虚组不同时间点肠道微生物丰度和物种组成变化情况。结果 与对照组同时间相比, 脾虚组 2、10、16 周时雌、雄性大鼠体重均显著减轻 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 脾虚组 2、10、16 周时大鼠尿 D-木糖排泄率显著降低, 2、10 周时血清淀粉酶亦降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。16S rDNA 测序结果显示, 肠道菌群 Beta 多样性分析中线性判别分析 (LDA) > 2 且在该组中丰度显著高的差异物种对照组有 8 种, 脾虚组 2 周时有 14 种, 10 周时有 27 种, 16 周有 8 种。Alpha 多样性分析结果: 与对照组相比, 脾虚组 2、10 周时大鼠肠道微生物 ACE、Observed 指数呈上升趋势, 16 周时有下降趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。脾虚组 16 周时大鼠 ACE、Observed 指数显著低于本组 2、10 周 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 脾虚组 2 周时大鼠肠道菌群 α -变形菌纲水平显著升高 ($P < 0.01$)。与脾虚组 2 周时相比, 脾虚组 10、16 周时 α -变形菌纲和放线菌纲水平下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 各时间点微菌纲差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 脾虚条件下大鼠体重减轻, 代谢功能降低, 其发生机制可能与肠道菌群丰度及物种数量变化相关, 且脾虚状态可随时间变化逐渐减轻。

关键词 脾虚; 肠道菌群; 16S rDNA 测序; 时效性

肠道菌群是肠道微生物生态系统的重要组成部分, 对机体消化吸收、能量供应、构建肠道黏膜屏障及维护肠道微生态平衡具有重要作用^[1-3]。人体中肠道菌群大体可分为 3 类: 专性厌氧菌 (如双歧杆菌和类杆菌)、兼性厌氧菌 (如大肠杆菌) 及病原菌 (如金黄色葡萄球菌), 其中专性厌氧菌是肠道微生物的优势菌属^[4]。研究^[5]发现, 肠道菌群常驻菌紧密排布于肠黏膜表面, 大大减少病原菌的致病机会。而肠道菌群稳态与多种疾病密切相关, 有研究^[6]已证实, 肠道菌群可通过代谢胆碱和磷酸酰胆碱产生三甲胺及氧化三甲胺进而导致动脉粥样硬化的发生。同时, 肠道菌群失调可导致毒

性代谢物经肠道进入肝肠循环, 继而加重肝脏疾病^[7]。在神经调节方面, 肠道微生物可影响神经发育和调节行为, 并导致神经紊乱及运动障碍^[8]。中医学认为, 脾主运化、主升清, 可蒸腾津液、布散全身。水谷运化有赖于脾气健运, 而全身营养供应、输布与中医脾脏升清功能密切相关, 说明中医脾的生理功能与机体消化吸收、能量供应、水液代谢等功能关系密切。研究^[9-10]发现, 脾虚是慢性腹泻及慢性肾脏病发生的核心病机。课题组前期提出, 肠道菌群稳态失衡是脾失健运膏脂转输障碍的重要环节^[11]。本研究探讨脾虚的不同时间段对肠道菌群变化的影响, 为脾虚状态下多种疾病发生提供科学的理论依据。

基金项目: 国家自然科学基金 (81774022); 辽宁省自然基金指导计划 (2019-ZD-0966)

* 通讯作者: jllq-8@163.com

1 材料

1.1 动物

SPF 级 SD 大鼠 48 只, 8 周龄, 雌雄各半, 体重 (190 ± 20) g, 由辽宁长生生物科技股份有限公司提供, 实验动物许可证号: SCXK (辽) 2015-0001。饲养于辽宁中医药大学实验动物中心, 单笼饲养, 温度 18 ~ 22 °C, 湿度 40% ~ 70%, 每天 12 h/12 h 昼夜明暗交替。本实验符合辽宁中医药大学实验动物伦理委员会标准, 实验动物伦理审查编号 21006092017056。

1.2 试剂

4% 多聚甲醛 (鼎国生物技术有限公司, 批号: AR-0211); D-木糖试剂盒、血清淀粉酶测试盒 (南京建成生物工程研究所, 批号: A035-C016); D-木糖 (索莱宝公司, 批号: SX8030); 水合氯醛 (天津市大茂化学试剂厂, 批号: AR 302-17-0); MiSeq 试剂盒 v3 (Illumina 公司, 批号: MS-102-30001); VAHTS DNA 纯化磁珠 (Vazyme 公司, 批号: N411-03); Top Taq DNA 聚合酶试剂盒 (Transgen 公司, 批号: AP151-01); dNTP 混合溶液 (Takara 公司, 批号: 4030); FastDNA™ 土壤 DNA 提取试剂盒 (MP Biomedicals 公司, 批号: 116560200); HotStart Taq 扩增试剂盒 (Takara 公司, 批号: R007WZ)。

1.3 仪器

JM1200 型电子天平 (余姚纪铭称重校验设备有限公司), SHZ-88 型水浴恒温振荡器 (其林贝尔仪器制造有限公司), ST16R 型冷冻高速离心机 (Thermo 公司), TAB-120FR 型全自动生化分析仪 (日本东芝公司), DM IL LED 型普通光学显微镜、ASP6025 型全自动脱水机、RM2235 型手动石蜡切片机、EG1150H 型包埋机、HI1220 型烘片机 (Leica 公司), SpectraMax® i3 型多功能酶标仪 (Molecular Devices 公司), NanoDrop 2000 型微量分光光度计、Invitrogen Qubit 3.0 型荧光定量仪、ABI 2720 型热循环仪 (Thermo Fisher Scientific 公司), Agilent 2100 型生物芯片分析仪 (Agilent Technologies 公司), MiSeq Benchtop Sequencer 型测序仪 (Illumina 公司)。

2 方法

2.1 动物造模及分组

48 只 SD 大鼠按体重水平随机区组法分为对照组和脾虚组, 每组又分为 2、10、16 周 3 个时间点, 每组每个时间点 8 只大鼠, 雌雄各半。采用饮

食不节加力竭游泳法^[12]建立脾气虚大鼠模型: 即饱食 1 天, 禁食 2 天, 饮水不限; 同时, 每日将大鼠于 35 ~ 37 °C 水中游泳至力竭, 连续 5 个循环, 共造模 15 天。当大鼠出现消瘦、食量减少、神疲乏力、毛色枯槁无光泽等表现时, 证明脾气虚造模成功^[13]。造脾虚模型 2 周后, 自由摄食, 饮水不限, 分别于 2、10、16 周取材。

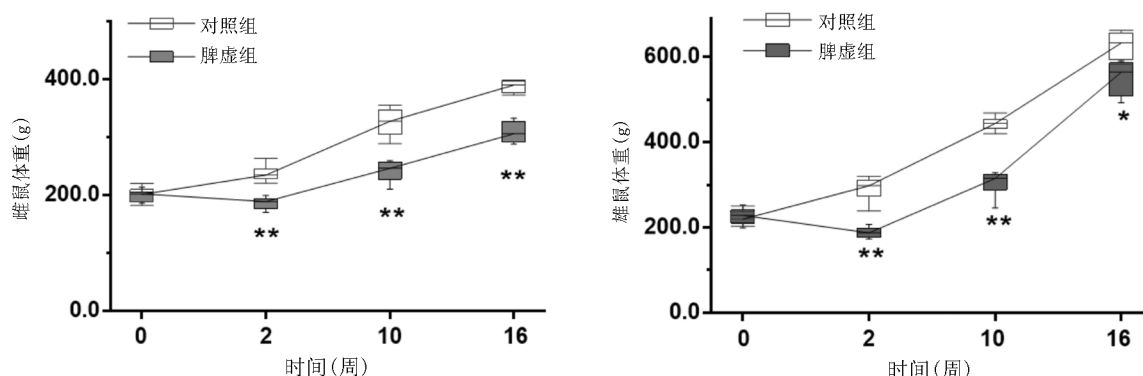
2.2 观察指标及方法

2.2.1 体重测定 分别于 0、2、10、16 周测定大鼠体重, 为了研究大鼠性别对脾虚状态下大鼠体重的影响, 分别对两组大鼠雌雄鼠体重进行比较。

2.2.2 D-木糖排泄率检测 每只大鼠灌胃 5% D-木糖 5 ml, 禁食不禁水, 5 h 后收集尿液并记录尿量, 取 5 μl 尿液, 用 45 μl 双蒸水稀释, 采用间苯三酚法测定, 按 D-木糖试剂盒说明书操作, 用分光光度计测各管吸光度, 并计算其对应 D-木糖排泄率, 即 5 h 尿中排出木糖 (g) / 灌胃木糖量 (g) × 100%。

2.2.3 血清淀粉酶检测 10% 水合氯醛麻醉后, 腹主动脉取血, 3000 r/min 4 °C 离心 30 min (离心半径 10 cm) 取血清, 按照大鼠血清淀粉酶测试盒说明书操作, 采用碘-淀粉比色法测定, 多功能酶标仪分别检测空白管、测定管在 660 nm 波长下的吸光度, 计算淀粉酶活力。

2.2.4 肠道微生物 16S rDNA 测序 大鼠腹腔内容物充分暴露后, 将盲肠用 1 × PBS 清洗后, 盲肠内容物迅速收集于 2 ml 无菌冻存管中, 标记后液氮中冻存 2 h 以上。通过扩增子测序方法对大鼠盲肠内容物进行菌群结果及丰度研究, 首先提取盲肠内容物 DNA、进行基因组 DNA 质量检测, 再通过对基因组目的区域进行 PCR 扩增, 将目标区域 DNA 扩增富集后, 各样本添加特异性 Index 序列, 通过高保真 PCR 对文库末端加入特异性标签序列, 便于区分不同标签序列样本, 再进行琼脂糖凝胶电泳, 应用核酸纯化磁珠对扩增产物进行纯化, 建立原始文库。Agilent 2100 型生物芯片分析仪检测测序文库插入片段大小并确定测序文库浓度, 采用 Miseq 平台进行上机测序, 后续进行生物信息学分析, 其中 Alpha 多样性分析通过计算菌群丰富度和多样性的指数来度量群落生态中的每个样本的物种丰富度和多样性, Beta 多样性分析通过各样本物种组成或物种间的进化关系及丰度信息计算样本间距离, 寻找样本间具有显著差异的微生物群落。Beta 多样性分析中 PCoA 用于不同生态系统之间多样性



注: 与对照组同时间比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图1 各组雌雄大鼠不同时间段体重比较

的比较,也就是样品间的差异,PCoA 结果中不同组样本之间分布越近,表示样本越相似,分布越远,表示样本差异越大; Alpha 多样性分析中 ACE 指数结果显示不同组样本之间群落丰富度变化,ACE 指数越大说明大鼠肠道微生物物种总数越多; Observed 指数结果显示不同组样本之间 OTUs 的直观数量统计,Observed 指数越大则大鼠肠道微生物 OUT 数就越多。

2.3 统计学方法

应用 GraphPad Prism 6.0 软件统计,计量资料符合正态分布以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较用 t 检验,组间两两比较采用 Tukey's 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组雌雄大鼠不同时间体重比较

图1 示,与对照组同时间比较,脾虚组 2、10、16 周时雌、雄性大鼠体重均显著减轻 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3.2 各组大鼠不同时间尿 D-木糖排泄率及血清淀粉酶活力比较

表1 示,与对照组同时间比较,脾虚组 2、10、16 周时大鼠 D-木糖排泄率显著降低,2、10 周时血清淀粉酶亦降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。其中脾虚组 2 周时大鼠 D-木糖排泄率明显低于 16 周时 ($P < 0.05$)。

3.3 各组大鼠肠道菌群 Beta 多样性分析结果

各组大鼠肠道菌群 Beta 多样性分析中性判别分析 (LDA) > 2 且在该组中丰度显著高的差异物种变化明显。其中,对照组中丰度显著高的差异物种有 8 种。脾虚组 2 周时差异物种有 14 种,10 周时差异物种有 27 种,16 周差异物种有 8 种。Beta 多样性分析 PCoA 结果见图 2,图中横坐标

(Axis. 1) 和纵坐标 (Axis. 2) 为样本间差异解释度最大的两个主要成分,结果示,对照组样本与脾虚组 2 周时样本结果图形分布最远,说明二者差异性最大,而脾虚组 10、16 周时样本结果图形与对照组样本结果图形相近,表示对照组与脾虚组 10、16 周时样本相近。

表1 各组大鼠不同时间尿 D-木糖排泄率及血清淀粉酶活力比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	D-木糖排泄率 (%)	血清淀粉酶活力 (U/dl)
对照组	2 周	6	28.90 $\pm$ 3.04	2212.47 $\pm$ 157.45
	10 周	6	29.02 $\pm$ 3.69	2184.78 $\pm$ 115.21
	16 周	6	29.22 $\pm$ 1.93	2131.63 $\pm$ 130.13
脾虚组	2 周	6	16.76 $\pm$ 2.87**	1778.92 $\pm$ 156.91**
	10 周	6	19.30 $\pm$ 3.19**	1854.94 $\pm$ 204.58**
	16 周	6	23.73 $\pm$ 2.93* Δ	2016.04 $\pm$ 86.94

注: 与对照组同时间比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与脾虚组 2 周比较, $\Delta P < 0.01$

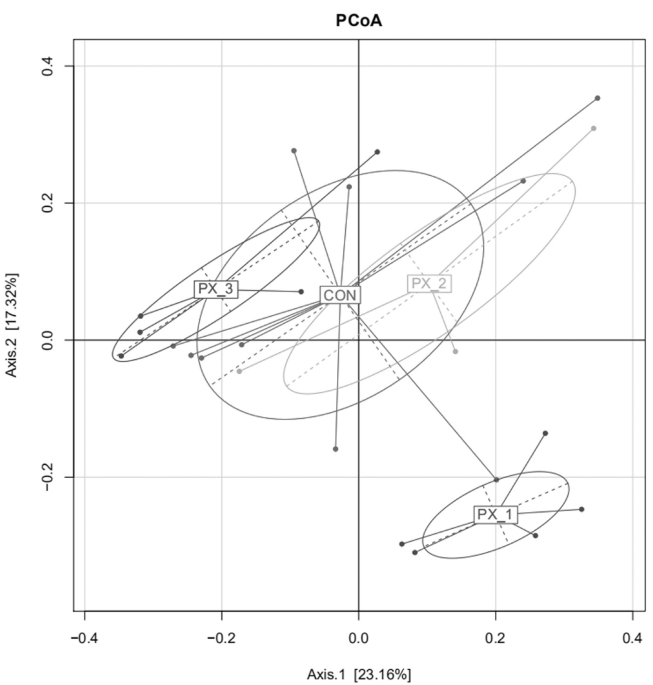
3.4 各组大鼠肠道菌群 Alpha 多样性分析结果比较

测序结果显示,各组大鼠肠道微生物 Alpha 多样性分析结果中 ACE、Observed 指数结果差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。表 2 示,与对照组相比,脾虚组 2、10 周时大鼠肠道微生物 ACE、Observed 指数呈上升趋势,16 周时有下降趋势,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。脾虚组 16 周时大鼠 ACE、Observed 指数显著低于本组 2、10 周

表2 各组大鼠肠道菌群 Alpha 多样性分析 ACE、Observed 指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	样本数	ACE 指数	Observed 指数
对照组		10	815.46 $\pm$ 90.32	674.00 $\pm$ 79.93
脾虚组	2 周	5	875.94 $\pm$ 82.46*	724.20 $\pm$ 73.86*
	10 周	3	937.74 $\pm$ 142.89*	781.33 $\pm$ 130.12*
	16 周	5	689.17 $\pm$ 103.69	541.60 $\pm$ 111.60

注: 与脾虚组 16 周比较, * $P < 0.05$



注: CON 表示对照组; PX_1 表示脾虚组 2 周;
PX_2 表示脾虚组 10 周; PX_3 表示脾虚组 16 周
图 2 各组大鼠肠道菌群 Beta 多样性分析 PCoA 结果
($P < 0.05$)。

3.5 各组大鼠肠道菌群纲层次各物种分布情况

表 3 示, 梭菌纲为纲层次中主要物种, 与对照组相比, 脾虚组 2 周时梭菌纲所占全部物种百分比呈下降趋势; 与脾虚组 2 周时相比, 脾虚组 10、16 周时梭菌纲所占全部物种百分比呈上升趋势。此外, 与对照组相比, 脾虚组 2 周时 α -变形菌纲、放线菌纲、疣微菌纲所占物种百分比呈上升趋势; 与脾虚组 2 周时相比, 脾虚组 10、16 周时 α -变形菌纲、放线菌纲、疣微菌纲所占物种百分比呈下降趋势。表 4 示, 与对照组相比, 脾虚组 2 周时大鼠肠道菌群 α -变形菌纲水平显著升高 ($P < 0.01$)。与脾虚组 2 周时相比, 脾虚组 10、16 周时 α -变形菌纲和放线菌纲水平下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 各时间点疣微菌纲差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 各组大鼠肠道菌群纲层次多样本物种组成
所占全部物种百分比 (%)

纲层次多样本物种	对照组 (10 只)	脾虚组 2 周 (5 只)	脾虚组 10 周 (3 只)	脾虚组 16 周 (5 只)
梭菌纲	58.421	45.001	55.559	52.412
丹毒丝菌纲	8.369	11.182	6.548	22.948
芽孢杆菌纲	9.967	16.827	11.930	10.479
拟杆菌纲	9.619	5.275	13.030	3.852
疣微菌纲	3.232	10.247	3.970	0.233
放线菌纲	3.695	5.679	1.270	1.812
螺旋体纲	2.230	0.561	2.424	1.580
δ -变形菌纲	1.283	1.398	3.279	0.463
γ -变形菌纲	0.298	0.119	0.199	5.175
未明确分类信息及名称	1.260	1.961	1.030	0.642
厌氧菌纲	0.644	0.846	0.343	0.065
ε -变形菌纲	0.534	0.234	0.054	0.108
未分类菌门	0.236	0.515	0.335	0.125
β -变形菌纲	0.151	0.034	0.011	0.029
α -变形菌纲	0.007	0.105	0.005	0.008
其他物种	0.055	0.016	0.012	0.069

4 讨论

脾在五行属土, 可运化谷物及水饮, 以化生气血, 营养周身。脾主统血、主升清, 可统摄血液于脉中、输布津液于肺及全身, 故称其为后天之本、气血生化之源。脾气健运是机体正常生命活动的保障^[4]。《脾胃论》云“脾胃虚则五脏六腑、十二经、十五络、四肢皆不得营运之气而百病出焉”, 揭示脾失健运是多种疾病的病理基础。脾失健运则气血生化无源、水谷精微输布障碍、气血循行受阻, 而致湿从中生, 痰从中聚, 进而引发膏脂运输障碍^[1]。而气血循行受阻可导致“清气在下”, 清气在下则生飧泄, 继而引发胃肠系统疾病。而肠道菌群作为人体超级生物体^[5], 对机体消化、免疫、炎症、脂质及能量代谢等方面作用显著^[6-18]。正常情况下, 肠道菌群可参与人体免疫及防御系统, 作为人体健康的重要防线, 保障机体正常的生命活动。当其稳态失衡时可作为致病因素引发多种疾病^[9]。现有研究^[20-22]发现, 肠道菌群稳态失衡是

表 4 各组大鼠肠道菌群纲层次中 α -变形菌纲、放线菌纲、疣微菌纲含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	样本数	α -变形菌纲	放线菌纲	疣微菌纲
对照组		10	0.000070 $\pm$ 0.000069	0.037 $\pm$ 0.023	0.032 $\pm$ 0.091
脾虚组	2 周	5	0.001047 $\pm$ 0.000903*	0.057 $\pm$ 0.027	0.102 $\pm$ 0.058
	10 周	3	0.000054 $\pm$ 0.000000 $^{\Delta}$	0.013 $\pm$ 0.004 $^{\Delta}$	0.040 $\pm$ 0.068
	16 周	5	0.000082 $\pm$ 0.000155 $^{\Delta\Delta}$	0.018 $\pm$ 0.008 $^{\Delta}$	0.002 $\pm$ 0.004

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$; 与脾虚组 2 周时比较, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

引起胃肠道疾病、高脂血症及心脑血管疾病的重要因素。可见脾虚状态及肠道菌群失衡是引起胃肠道及脂质代谢性疾病的重要病机。

本研究结果显示,脾虚条件下雌、雄大鼠 2、10、16 周体重均较对照组大鼠减轻。根据 D-木糖排泄率及血清淀粉酶活力结果可知,脾虚组 2 周时大鼠脾虚状态最为严重,而随着时间的推移,脾虚状态逐渐好转,进而推测脾虚状态可随时间推移而改善。肠道菌群结果显示,与对照组相比,脾虚组 2、10 周时大鼠 Beta 多样性分析中 LDA > 2 且丰度显著高的差异物种数明显增多,而 16 周时 LDA > 2 且丰度显著高的差异物种数呈下降趋势,说明脾虚条件可影响肠道菌群物种丰富度及显著差异物种数量,其中以纲层次尤为明显。结果显示,梭菌纲是纲层次优势菌属,其水平在脾虚条件下呈下降趋势。与梭菌纲同属厚壁菌门的主要菌纲芽孢杆菌纲水平在脾虚条件下呈上升趋势,由此可见,脾虚条件下厚壁菌门中相关菌纲水平变化明显。脾虚组在 10、16 周时 α -变形菌纲、放线菌纲水平较 2 周时明显下降。以上结果说明脾虚状态对肠道菌群的影响可能随时间变化而逐渐减轻直至恢复正常。

近年来,随着肠道菌群研究的不断深入,发现脂质代谢在变化菌群众多调节机制中作用显著^[23-24]。因此,脾虚状态影响大鼠肠道菌群纲层次 α -变形菌纲、放线菌纲等多种菌群的调控,其中机制可能与脂质代谢密切相关,需进一步研究。

参考文献

- [1] 欧阳晓玲,邢凤媛. 肠道微生态改变与消化系统有关疾病的临床研究进展 [J]. 检验医学与临床, 2017, 14 (6): 895-897.
- [2] 李晨,陈伟,王猛,等. 肠道菌群失调与消化系统疾病相关性研究进展 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2019, 25 (2): 203-206.
- [3] 武娜. 结直肠癌患者及健康人肠道菌群结构差异研究 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2013.
- [4] 车轶文,于宁,翟双庆. 脾与肠道菌群相关性的理论探析 [J]. 世界中医药, 2015, 10 (5): 703-705, 709.
- [5] 尹军霞,林德荣. 肠道菌群与疾病 [J]. 生物学通报, 2004, 39 (3): 26-28.
- [6] 郭慧玲. 肠道菌群与疾病关系的研究进展 [J]. 微生物学通报, 2015, 42 (2): 400-410.
- [7] 候静,路越,张德凯. 肠道菌群失调与肝脏疾病的关系 [J]. 临床肝胆病杂志, 2018, 34 (5): 1128-1132.
- [8] SAMPSON TR, DEBELIUS JW, THRON T, et al. Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of parkinson's disease [J]. Cell, 2016, 167 (6): 1469-1480.
- [9] 刘晴,王垂杰. 肠道菌群失调致慢性腹泻的“脾虚”论治 [J]. 中医临床杂志, 2017, 29 (12): 2032-2034.
- [10] 邹川,吴禹池,卢钊宇,等. 从肠道菌群及其代谢探索从脾论治慢性肾脏病的理论和实践 [J] // 中华中医药学会. “新成果·新进展·新突破”中华中医药学会 2013 年学术年会、第三次中华中医药科技成果论坛论文集. 北京: 中华中医药学会, 2013: 242-247.
- [11] 贾连群,宋囡,张妮,等. 基于“脾主运化”理论探讨肠道微生物稳态与膏脂转输的关系 [J]. 中医杂志, 2017, 58 (18): 1554-1557.
- [12] 郑小伟. 中医实验动物模型方法学 [M]. 上海: 上海中医药大学出版社, 1999: 63-64.
- [13] 姜晓琳,张立德. 脾气虚证模型大鼠中 BNP 介导的 cAMP-PKA 信号通路对 bFGF 表达的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32 (2): 251-255.
- [14] 周作文. 中医“脾主运化”理论核心术语研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2015.
- [15] 何云山,惠华英,谭周进. 中医脾胃病的特征肠道菌群在中医诊疗中的作用 [J]. 世界华人消化杂志, 2019, 27 (10): 605-610.
- [16] 司原成. 健脾益气针法对肥胖鼠肠道菌群及肠黏膜 TLRs/TRAFF6 信号通路的调控研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2017.
- [17] 黄源春,谭学瑞. 肠道菌群与心血管疾病相关: 现状与未来 [J]. 世界华人消化杂志, 2017, 25 (1): 31-42.
- [18] 徐燕飞,高利. 肠道菌群对动脉粥样硬化作用机制的研究概述 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2017, 15 (17): 2126-2128.
- [19] 王珂,黄孝天. 肠道菌群调控机体免疫功能的研究进展 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2018, 34 (2): 186-190.
- [20] OU Y, ZHANG C, YAO M. Gut flora: novel therapeutic target of Chinese medicine for the treatment of cardiovascular diseases [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019: 3719596. doi: 10.1155/2019/3719596.
- [21] THUMANN TA, PFERSCHY-WENZIG EM, MOISSL-EICHINGER C. The role of gut microbiota for the activity of medicinal plants traditionally used in the European Union for gastrointestinal disorders [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 245: 112153. doi: 10.1016/j.jep.2019.112153.
- [22] MA H, ZHANG B, HU Y, et al. Correlation analysis of intestinal redox state with the gut microbiota reveals the positive intervention of tea polyphenols on hyperlipidemia in high fat diet fed mice [J]. J Agric Food Chem, 2019, 67 (26): 7325-7335.
- [23] DI S, WANG Y, HAN L, et al. The intervention effect of traditional Chinese medicine on the intestinal flora and its metabolites in glycolipid metabolic disorders [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019: 2958920. doi: 10.1155/2019/2958920.
- [24] 韩璿. 肠膜明串珠菌在脱脂乳蔗糖培养基中的产糖特性 [J]. 食品研究与开发, 2014 (19): 5.

Study on the Distribution and Timeliness of Intestinal Flora in Spleen Deficiency Model Rats

ZHENG Haolong^{1,2}, CHEN Si¹, SONG Nan^{1,3}, CAO Huimin^{1,3}, WU Yao¹, WANG Jie¹, JIA Lianqun^{1,3}

1. Ministry of Education Key Laboratory of Theory and Application of Visceral Manifestations of Traditional Chinese Medicine; 2. General Hospital of North Theater Command; 3. Center of Traditional Chinese Medicine Innovation Engineering Technology, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To investigate the effects and timeliness of spleen deficiency on intestinal microorganisms using 16S rDNA sequencing technology of intestinal microorganisms. **Methods** A total of 48 rats were randomly divided into a control group and a spleen-deficiency group, and each group was divided into 3 subgroups of time points 2, 10, and 16 weeks. Each group had 8 rats at each time point, half male and half female. The spleen-deficiency group established a model of spleen-deficiency by irregular diet and strenuous swimming. Body weights of male and female rats were measured at 0, 2, 10, and 16 weeks, and urine D-xylose excretion rate and serum amylase activity were detected at 2, 10, and 16 weeks. Intestinal microbiota Beta diversity analysis and Alpha diversity analysis were used to compare changes in intestinal microbial abundance and species composition at different time points in the control group and the spleen deficiency group. **Results** Compared with the control group at the same time, the weight of female and male rats in the spleen-deficiency group was significantly reduced at 2, 10, and 16 weeks ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the urine D-xylose excretion rate of rats in the spleen-deficiency group was decreased significantly at 2, 10, and 16 weeks, and serum amylase also decreased at 2 and 10 weeks ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). 16S rDNA sequencing results showed that in analysis of intestinal flora Beta diversity, there were 8 species in the control group with linear discriminant analysis (LDA) > 2 and with significantly higher abundance in the group. The number of species in the spleen deficiency group was 14 at 2 weeks, 27 at 10 weeks and 8 at 16 weeks. Alpha diversity analysis results showed that compared with the control group, the intestinal microbial ACE and Observed index of rats in the spleen-deficiency group showed an upward trend at 2 and 10 weeks, and a downward trend at 16 weeks, but there was no statistically significant difference ($P > 0.05$). The ACE and Observed index of rats in the spleen-deficiency group at 16 weeks were significantly lower than that of the group at 2 and 10 weeks ($P < 0.05$). Compared with the control group, the level of α -proteobacteria in the intestinal flora of the spleen-deficiency group increased significantly at 2 weeks ($P < 0.01$). Compared with the spleen deficiency group at 2 weeks, the levels of α -proteobacteria and actinomycetes decreased at 10 and 16 weeks in the spleen deficiency group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and there was no statistically significant difference in verruca microflora at each time point ($P > 0.05$). **Conclusion** The weight loss and metabolic function of rats under spleen deficiency conditions may be related to the changes in the abundance of intestinal flora and the number of species, and the state of spleen deficiency may gradually decrease with time.

Keywords spleen deficiency; intestinal flora; 16S rDNA sequencing; timeliness

(收稿日期: 2019-09-26; 修回日期: 2020-02-19)

编辑: 邓 媛

(上接第 1261 页)

[2] 陈建钢, 吴小燕. 中西医结合治疗舌微循环障碍 [J]. 华西口腔医学杂志, 2000, 18(2): 101-102.

[3] 沈扬, 王继琛. 无症状性脑梗塞的临床特点 [J]. 中华神

经科杂志, 1996, 29(6): 370-370.

[4] 徐丽, 孙悦, 王河宝, 等. 基于文献探讨舌诊在中风病健康管理中的应用价值 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 25(3): 326-329.

Clinical Significance of Tongue Inspection in the Diagnosis of Aura of Apoplexy

SHI Guodong, SUN Yue, DING Chenghua, QI Chengcheng, XU Li, LI Qi

School of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang, 330004

ABSTRACT Tongue inspection is one of the unique diagnostic methods of traditional Chinese medicine. This paper summarizes the characteristics and regulations by analyzing the observation and research of tongue manifestation of patients with apoplexy aura from different perspective of tongue condition, tongue color, tongue coating, collaterals under tongue, taste sense and pain sense. It has been found that the tongue manifestation of patients with aura of apoplexy often has many highly directional characteristics. It has certain clinical guidance significance for distinguishing the nature of the disease, inferring the severity of the condition and judging the prognosis and transfer of the disease.

Keywords aura of apoplexy; tongue inspection; tongue condition; tongue manifestation; tongue pain; taste disturbance

(收稿日期: 2019-09-03; 修回日期: 2019-10-11)

编辑: 崔京艳