

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2021.23.008

临床研究

六神丸对健康人上呼吸道菌群结构和多样性的影响

徐霄龙, 陈奕杉, 白云静, 郭玉红, 刘清泉✉

首都医科大学附属北京中医医院, 北京市东城区美术馆后街 23 号, 100010



[摘要] 目的 基于 16S rRNA 高通量测序技术探讨六神丸对健康人上呼吸道菌群微生态的影响。方法 选择 2020 年 11 月 2 日至 11 月 20 日在北京中医药大学及首都医科大学招募的 60 名健康受试者为研究对象, 随机分为对照组和六神丸组各 30 例。对照组不给予药物干预; 六神丸组给予六神丸含服 3 粒+口服 7 粒, 每日 3 次, 共 7 天。对照组于招募后第 8 天、六神丸组于服药后第 8 天采集受试者咽拭子样本进行 16S rRNA 高通量测序检测, 分析 Alpha 多样性、Beta 多样性和菌群结构差异。结果 与对照组比较, 六神丸组 Chao1 指数和 Shannon 指数增高 ($P<0.05$); 对照组和六神丸组非度量多维标定 (NMDS) 组间分布具有差异, NMDS1 轴强系数=0.1590。厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门、梭杆菌门、放线菌门和髌骨细菌门为两组在门水平的优势菌。与对照组比较, 六神丸组疣微菌门、硝化螺旋菌门、芽单胞菌门、蓝藻细菌门、绿弯菌门和酸杆菌门相对丰度增高 ($P<0.05$); 变形菌门、埃普西隆杆菌门和拟杆菌门相对丰度降低 ($P<0.05$)。结论 六神丸对上呼吸道菌群的多样性、丰度和结构均有调节作用, 提示六神丸可能通过改善菌群失调对某些呼吸系统疾病起到预防或治疗作用。

[关键词] 上呼吸道; 菌群多样性; 六神丸; 高通量测序技术

呼吸道微生物菌群形成的屏障是病毒、细菌等致病菌进入人体后遇到的第一层天然屏障, 在抵抗感染的过程中发挥着重要的作用。成人呼吸道表面积约为 70 m^2 , 整个表面都有特定的细菌群落, 在上呼吸道中观察到的菌群密度最高^[1]。呼吸道菌群可直接或间接地参与呼吸生理过程和宿主免疫稳态调节。当呼吸道菌群稳态异常时, 内环境的改变会导致致病菌更易定植、感染机体^[2]。如何调节呼吸道微生物菌群的结构及功能, 以及这些菌群如何影响宿主是当前的研究热点。六神丸组方源于清朝“雷允上涌芬堂”的药铺方, 具有清凉解毒、消炎止痛的功效, 常用于急性扁桃体炎、急性支气管炎、流行性感冒等口咽部及呼吸系统疾病的治疗^[3-5]。近年来, 基于新一代测序技术的发展, 我们对呼吸道常驻菌群的结构及功能有了进一步的了解。本研究采用 16S rRNA 高通量测序技术^[6], 探讨六神丸对健康人上呼吸道菌群多样性及结构的影

响, 为其临床应用提供理论依据。本研究经过首都医科大学附属北京中医医院伦理委员会批准 (批件号: 2019BL02-047-02)。

1 资料与方法

1.1 纳入标准

年龄 ≥ 18 周岁的健康受试者; 男性体重 $\geq 50\text{ kg}$, 女性体重 $\geq 45\text{ kg}$, 体重指数(BMI)为 $19.0\sim 26.0\text{ kg/m}^2$; 生命体征检查、体格检查、临床实验室检查、腹部 B 超、心电图结果显示无异常或异常但无临床意义者; 受试者能够与研究进行良好的沟通, 并签署知情同意书。

1.2 排除标准

近 2 个月内应用抗生素者; 3 年内有循环、泌尿、呼吸、血液或淋巴、内分泌或免疫、精神、神经、消化等系统慢性疾病史; 有妊娠可能、妊娠期或哺乳期女性; 有吸烟史; 过敏体质者, 有中药过敏史; 近 3 个月内参加其他试验者。

1.3 一般资料

选择 2020 年 11 月 2 日至 11 月 20 日在北京中医

基金项目: 国家卫生计生委医药卫生科技发展研究中心科技重大专项(2017ZX10305501)

✉ 通讯作者: liuqinguan_2003@126.com, 010-52176965

药大学及首都医科大学招募的 60 名健康受试者为研究对象, 采用随机数字表法分为对照组和六神丸组各 30 人。其中对照组男性 13 人、女性 17 人, 六神丸组男性 12 人、女性 18 人; 对照组年龄 24~26 岁, 平均年龄(25±1)岁, 六神丸组 23~26 岁, 平均年龄(25±2)岁; 对照组 BMI 19.00~22.54 kg/m², 平均(20.72±1.82) kg/m², 六神丸组(19.16~22.80) kg/m², 平均(20.98±1.82) kg/m²。两组性别、年龄、BMI 差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.4 干预方法

对照组: 无任何干预。

六神丸组: 给予六神丸〔每支 10 粒, 每 1000 粒重 3.125 g; 成分: 牛黄、麝香、珍珠、蟾酥、雄黄、冰片; 由雷允上药业集团有限公司(苏州)提供, 批号 RA18029A〕含服 3 粒+口服 7 粒, 每日 3 次, 共干预 7 天。

1.5 咽拭子采集

对照组于招募后第 8 天、六神丸组于服药后第 8 天采集咽拭子样本。样本采集均在清晨, 所有研究对象均禁止刷牙、漱口、吃早餐。严格遵守咽拭子样本采集流程, 取样时拭子不能接触到牙齿、口腔黏膜和舌黏膜。标本收集完后, 置于-80℃的冰箱中保存后送检。

1.6 主要仪器和试剂

高通量测序平台(Novaseq 6000 型, 美国 Illumina 公司)、超微量分光光度计(NanoDrop2000 型, 美国 Thermo 公司)、生物分析仪(2100 Bioanalyzer 型, 美国 Agilent 公司)、实时定量 PCR 仪(ABI7500 型, 美国 Bio-Rad 公司)、高速离心机(Legend Micro21 型, Eppendorf 公司)、振荡器(G560E 型, 美国 Scientific Industries 公司)、酶标仪(Synergy HTX 型, Gene Company Limited 公司)。

DNA 提取试剂盒(德国 MACHERY-NAGEL 公司, 货号: 7406506.90)、微量 DNA 纯化试剂盒(Omega 公司, 货号: D6296-01)、DNA 胶回收试剂盒(Monarch 公司, 货号: T1020L)、PCR 酶(Toyobo 公司, 货号: KOD FX Neo KFX-101)。

1.7 DNA 提取、建库测序及数据分析

根据 DNA 提取试剂盒步骤对咽拭子标本进行核酸提取, 对 DNA 样品进行浓度、片段分布、OD260/280、OD260/230 和琼脂糖凝胶电泳等进行质检。根据保守区设计得到引物, 在引物末端加上测序接头, 进行 PCR 扩增并对其产物进行纯化、定量和均一化形成测序文库。对于构建好的文库使

用 Illumina 高通量测序平台进行上机测序(北京百迈客生物科技有限公司)。得到的原始图像数据文件, 经碱基识别分析转化为原始测序序列(Reads), 结果以 FASTQ 文件格式存储, 其中包含 Reads 的序列信息以及其对应的测序质量信息。数据预处理包括 Raw reads 过滤、高质量 Reads 拼接和去除嵌合体。首先使用 Trimmomatic v0.33 软件, 对测序得到的 Raw Reads 进行过滤; 然后使用 cutadapt 1.9.1 软件进行引物序列的识别与去除, 得到不包含引物序列的高质量 Reads; 使用 FLASH v1.2.7 软件, 通过 overlap 对每个样品高质量的 Reads 进行拼接, 得到的拼接序列即 Clean Reads; 使用 UCHIME v4.2 软件, 鉴定并去除嵌合体序列, 得到最终有效数据。

根据文献[6-7]对高通量数据进行生物信息学分析, 主要包括 Alpha 多样性(含 Chao1 指数和 Shannon 指数分析, 可以较客观地反映样本中的物种丰度及物种多样性。Chao1 指数主要反映物种丰度, Shannon 指数主要反映物种多样性)、Beta 多样性[非度量多维标定(NMDS)分析, 可将多维空间的研究对象(样本或变量)简化到低维空间进行定位、分析和归类, 通过样本的分布可以看出组间或组内差异, 点与点之间的距离表示差异程度; NMDS 分析包括 NMDS1 和 NMDS2 两个维度]和组间微生物差异显著性分析。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析, 所有数据均符合正态分布, 以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。组间差异性分析采用 Mann-Whitney U 检验(两组独立样本, 样本数大于 20)。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组健康受试者上呼吸道菌群样本测序深度和物种丰富度分析

60 个样品测序共获得 4 707 595 对 Reads, 双端 Reads 质控、拼接后共产生 4 645 361 条 Clean Reads, 每个样品至少产生 57 599 条 Clean Reads, 平均产生 77 423 条 Clean Reads。稀释性曲线可用来评价测序量是否足以覆盖所有类群, 并间接反映样品中物种的丰富程度。对照组和六神丸组稀释曲线结果见图 1(扫描本文二维码获取彩图)。所有样本稀释曲线在采样序列数 2000 左右操作分类单位出现拐点, 测序序列 10 000 左右趋于平缓或达到平台期, 证明所有样本测序深度已经基本覆盖到所有物种。

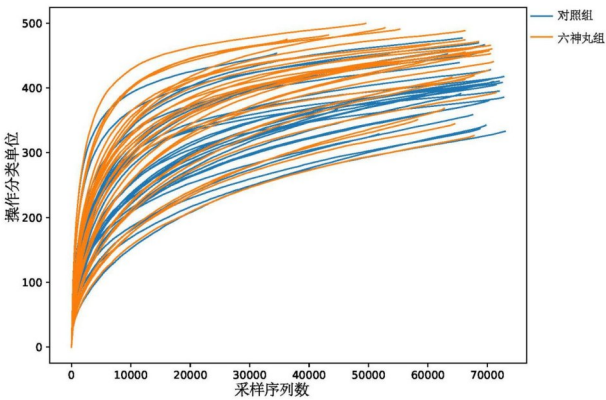


图1 两组健康受试者上呼吸道样本高通量测序稀释曲线图

2.2 两组健康受试者上呼吸道菌群样本 Alpha 多样性分析

图2示，与对照组比较，六神丸组 Chao1 指数和 Shannon 指数均增高，差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。

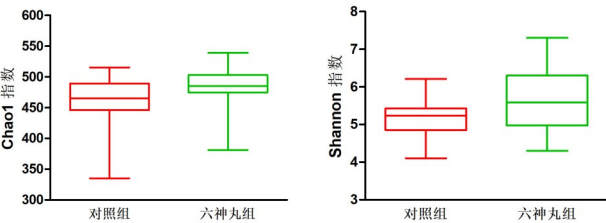


图2 两组健康受试者上呼吸道菌群样本 Alpha 多样性分析

2.3 两组健康受试者上呼吸道菌群样本 Beta 多样性分析

图3 (扫描本文二维码获取彩图) 示，NMDS1 胁强系数=0.1590<0.2，认为此分析较为可靠。对照组主要分布在NMDS1 0点右侧；六神丸组主要分布在NMDS1 0点左侧、NMDS2 0点下方，相对集中、距离近，与对照组相比组间分布具有差异。

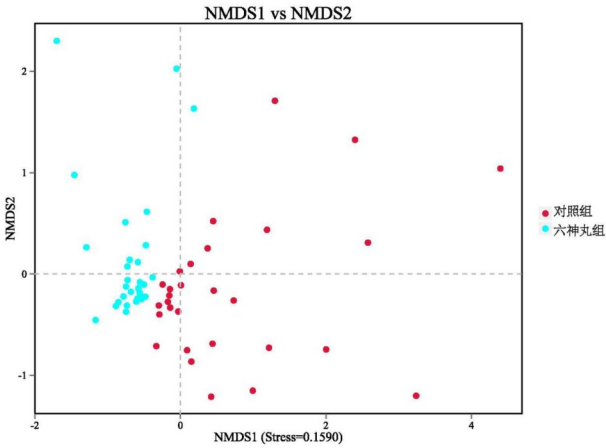


图3 两组健康受试者上呼吸道菌群样本 Beta 多样性分析

2.4 两组健康受试者上呼吸道菌群组成差异

图4 (扫描本文二维码获取彩图) 示，对照组和六神丸组上呼吸道在门水平优势菌 (相对丰度>1%) 组成相近，包括厚壁菌门 (*Firmicutes*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、变形菌门 (*Proteobacteria*)、梭杆菌门 (*Fusobacteria*)、放线菌门 (*Actinobacteria*) 和髌骨细菌门 (*Patescibacteria*)。

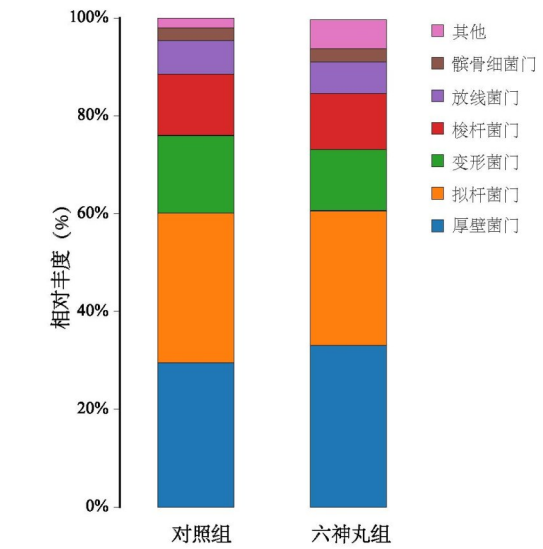


图4 两组健康受试者上呼吸道样本在门水平优势菌

表1示，两组在门水平比较具有差异的菌包括：疣微菌门 (*Verrucomicrobia*)、变形菌门 (*Proteobacteria*)、硝化螺旋菌门 (*Nitrospirae*)、芽单胞菌门 (*Gemmatimonadetes*)、埃普西隆杆菌门 (*Epsilonbacteraeota*)、蓝藻细菌门 (*Cyanobacteria*)、绿弯菌门 (*Chloroflexi*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、酸杆菌门 (*Acidobacteria*) ($P<0.05$)。与对照组比较，六神丸组疣微菌门、硝化螺旋菌门、芽单胞菌门、蓝藻细菌门、绿弯菌门和酸杆菌门相对丰度增

表1 两组健康受试者上呼吸道样本在门水平差异菌 相对丰度值比较 (%)		
菌门	六神丸组	对照组
疣微菌门	0.689±0.775 ^{a)}	0.063±0.102
变形菌门	11.345±6.417 ^{a)}	16.034±8.794
硝化螺旋菌门	0.045±0.080 ^{a)}	0.011±0.007
芽单胞菌门	0.038±0.033 ^{a)}	0.017±0.018
埃普西隆杆菌门	0.426±0.471 ^{a)}	0.599±0.496
蓝藻细菌门	1.167±3.313 ^{a)}	0.215±0.378
绿弯菌门	0.049±0.046 ^{a)}	0.025±0.024
拟杆菌门	27.004±8.780 ^{a)}	30.723±8.057
酸杆菌门	0.442±0.311 ^{a)}	0.117±0.076

注：a) 与对照组比较， $P<0.05$ 。

高,变形菌门、埃普西隆杆菌门和拟杆菌门相对丰度降低,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

呼吸道是一个开放的通道,人出生后各种致病菌和非致病菌开始定植于呼吸道黏膜表面。微生物的种群和数量随着年龄增长逐渐趋于稳定,在维持呼吸道健康、防止呼吸道病原体形成感染并扩散到下呼吸道中发挥重要的作用^[1]。上呼吸道包括前鼻孔、鼻腔通道、鼻旁窦、鼻咽和口咽以及声带上方的喉部。对于大多数呼吸道细菌病原体来说,上呼吸道定植是造成上、下呼吸道感染的第一步。上呼吸道常驻菌群对于其他病原菌再定植也具有抑制能力,称为“定植抵抗”;对于已经定植的病原体,微生物菌群在黏膜形成屏障,防止病原体增殖和局部及全身的扩散^[8]。除此之外,呼吸道微菌群还可通过调节免疫细胞的成熟和功能调节局部免疫反应^[9]。上呼吸道通常被认为是潜在病原体(包括肺炎链球菌)扩散并随后向肺传播的主要储存库,因此在上呼吸道中建立和维持对病原体扩展和侵袭具有恢复力的平衡菌群对呼吸系统健康至关重要^[1]。在上呼吸道中,鼻咽部是连接呼吸道和外界环境的部位,最易受到环境因素的影响^[10]。本研究选择健康受试者咽拭子样本进行研究,采用成熟高效的二代高通量测序技术,基于客观的生物信息学分析,探讨六神丸对健康人上呼吸道菌群的影响。

环境因素以及微生物-微生物和宿主-微生物的相互作用均可影响菌群的丰度、多样性、结构,从而影响其功能^[11]。有研究提示,呼吸道菌群多样性降低多与哮喘、呼吸道感染、肺动脉高压等呼吸系统疾病的发生发展相关^[12-13]。一项对 240 名 6 个月至 3 岁儿童的横断面研究结果提示,在急性上呼吸道感染患者中,肺炎链球菌、流感嗜血杆菌和卡他莫拉菌等致病菌的定植与上呼吸道菌群多样性水平较低相关^[14]。有学者^[15]通过对 10 名健康受试者和 10 名慢性鼻窦炎患者的队列研究发现,与健康受试者相比,慢性鼻窦炎患者上呼吸道菌群多样性显著降低,并通过相关动物实验证实了健康的黏膜微生物群对于潜在致病菌的抵抗作用。本研究发现,对于健康人进行六神丸干预后上呼吸道菌群的 Alpha 多样性 Chao1 指数和 Shannon 指数增高,差异具有统计学意义;反映 Beta 多样性的 NMDS 二维图显示对照组和六神丸组菌群具有差异,提示六神丸对呼吸道菌群具有一定的良性调节作用,为其

预防呼吸系统疾病的潜在作用提供一定思路。

六神丸组分中牛黄、蟾酥、冰片具有消肿解毒、通络止痛的作用,雄黄可燥湿,珍珠可安神,麝香具有提神醒脑、活血通络的作用,临床可用于治疗喉风喉痹、痈疡疔疮、无名肿毒等症。本研究结果表明,与对照组比较,六神丸组疣微菌门、变形菌门、拟杆菌门、酸杆菌门等具有显著的差异。变形菌门是细菌中最大的菌门,包括具有临床意义的病原体(如假单胞菌属、嗜血杆菌属)^[16]。Borges 等^[17]对流行性感冒患者和健康受试者鼻咽抽吸标本的菌群进行研究后,发现两组受试者变形菌门和厚壁菌门相对丰度存在差异,流行性感冒患者的链球菌富集,假单胞菌丰度降低。一项对 106 例稳定期支气管扩张症患者和 17 名健康人的痰标本进行的 16S rRNA 测序结果^[18]发现,变形菌门和假单胞菌属分别是中、重度支气管扩张症的主要菌门和菌属,提示变形杆菌的组成可能与支气管扩张的严重程度有关。本研究结果提示,六神丸可能通过调节某些菌群结构,对疾病的发生具有预防作用。

目前关于疣微菌门、硝化螺旋菌门、芽单胞菌门、蓝藻细菌门等与人体疾病或健康的研究少见报道。呼吸道菌群受到疾病状态、季节、环境等复杂因素影响,六神丸是否可以通过调节菌群从而发挥预防或治疗疾病的作用,还需要借助更大样本量临床随机对照试验或动物实验进行验证。

参考文献

- [1] MAN WH, WAADSPITERS, BOGAERT D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15(5):259-270.
- [2] BOGAERT D, GROOT DR, HERMANS PW. Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease [J]. *Lancet Infect Dis*, 2004, 4(3):144-154.
- [3] 秦湧. 六神丸治疗流行性感冒的临床观察 [J]. *中草药*, 2021, 52(6):1687-1691.
- [4] 史苗颜, 李善群, 石克华, 等. 六神丸联合基础治疗对支气管扩张症急性加重期风热犯肺证患者的临床疗效 [J]. *中成药*, 2020, 42(8):2243-2245.
- [5] 高祥华. 六神丸联合抗生素治疗急性扁桃体炎的临床疗效观察 [J]. *中国药物经济学*, 2019, 14(2):62-65.
- [6] YU G, PHILLIPS S, GAIL MH, et al. The effect of cigarette smoking on the oral and nasal microbiota [J]. *Microbiome*, 2017, 5(1):3.
- [7] 王平, 赵澄, 卢芳国, 等. A 型流感病毒对小鼠肺部菌群及趋化因子 CCL5 和 CXCL10 的影响及麻杏石甘汤干预作用研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(21):5523-5537.

- [8] BAKALETZ LO. Viral-bacterial co-infections in the respiratory tract [J]. Curr Opin Microbiol, 2017, 35: 30-35. doi: 10.1016/j.mib.2016.11.003.
- [9] OLSZAK T, AN D, ZEISSIG S, et al. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function [J]. Science, 2012, 336(6080): 489-493.
- [10] CHEN T, YU WH, IZARD J, et al. The human oral microbiome database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information [J]. Database (Oxford), 2010, 2010: 13. doi: 10.1093/database/baq013.
- [11] ZHOU Y, JACKSON D, BACHARIER LB, et al. The upper-airway microbiota and loss of asthma control among asthmatic children [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 5714.
- [12] 张磊, 吕小琴, 狄浩然, 等. 流感病毒与呼吸道微生态相关性研究进展 [J]. 世界中医药, 2018, 13(2): 283-286, 289.
- [13] ZHANG C, ZHANG T, LU W, et al. Altered airway microbiota composition in patients with pulmonary hypertension [J]. Hypertension, 2020, 76(5): 1589-1599.
- [14] PETTIGREW MM, LAUFER AS, GENT JF, et al. Upper respiratory tract microbial communities, acute otitis media pathogens, and antibiotic use in healthy and sick children [J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(17): 6262-6270.
- [15] ABREU NA, NAGALINGAM NA, SONG Y, et al. Sinus microbiome diversity depletion and Corynebacterium tuberculoearicum enrichment mediates rhinosinusitis [J]. Sci Transl Med, 2012, 4(151): 151-124.
- [16] TUNNEY MM, FIELD TR, MORIARTY TF, et al. Detection of anaerobic bacteria in high numbers in sputum from patients with cystic fibrosis [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2008, 177(9): 995-1001.
- [17] BORGES LGDA, GIONGO A, PEREIRA LDM, et al. Comparison of the nasopharynx microbiome between influenza and non-influenza cases of severe acute respiratory infections: a pilot study [J]. Health Sci Rep, 2018, 1(6): 47.
- [18] GUAN WJ, YUAN JJ, LI HM, et al. Proteobacteria community compositions correlate with bronchiectasis severity [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2018, 22(9): 1095-1105.

Effect of *Liushen Pill* (六神丸) on the Constitution and Diversity of Upper Respiratory Tract Flora in Healthy People

XU Xiaolong, CHEN Yishan, BAI Yunjing, GUO Yuhong, LIU Qingquan

Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing, 100010

ABSTRACT Objective To investigate the effect of *Liushen Pill* (六神丸) on the microecology of upper respiratory tract flora in healthy people based on 16S rRNA high-throughput sequencing technology. **Methods** A total of 60 healthy subjects were recruited in Beijing University of Chinese medicine and Capital Medical University from November 2nd to 20th, 2020, and were randomly divided into control group and *Liushen Pill* group with 30 in each group. No medication was given to the control group and the *Liushen Pill* group was treated with 3 pills (sucked) + 7 pills (swallowed) of *Liushen Pill* for 7 days, three times a day. On the 8th day of inclusion or after administration, throat swab samples were collected from the control group or *Liushen Pill* group through 16S rRNA high-throughput sequencing, to analyze alpha diversity, beta diversity and flora constitution. **Results** Compared to those in the control group, the Chao1 index and Shannon index in the *Liushen Pill* group were higher ($P < 0.05$). The distribution of the non-metric multidimensional scaling (NMDS) was significantly different between the control group and the *Liushen Pill* group, with NMDS1 stress coefficient=0.1590. *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria* and *Patescibacteria* were the dominant phyla in both groups. Compared to the control group, the relative abundance of *Verrucomicrobia*, *Nitrospirae*, *Gemmatimonadetes*, *Cyanobacteria*, *Chloroflexi* and *Acidobacteria* in the *Liushen Pill* group significantly increased ($P < 0.05$), and the relative abundance of *Proteobacteria*, *Epsilonbacteraeota* and *Bacteroidetes* significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** *Liushen Pill* has effects on the diversity, abundance and constitution of the upper respiratory tract flora in healthy people. It is suggested that *Liushen Pill* may have potential effect on preventing and treating certain respiratory diseases.

Keywords the upper respiratory tract; flora diversity; *Liushen Pill* (六神丸); high-throughput sequencing

(收稿日期: 2021-06-04; 修回日期: 2021-08-25)

[编辑: 叶晨]