

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.12.013

小承气汤对重型颅脑损伤模型大鼠急性期肠道菌群的影响

彭玲玲^{1,2}, 梁仁久¹, 宁玲³, 杜宜衡¹, 黄贵华¹✉

1. 广西中医药大学, 广西壮族自治区南宁市青秀区五合大道13号, 530200; 2. 广西医科大学第一附属医院; 3. 湖南中医药大学

[摘要] 目的 从肠道菌群角度探讨小承气汤治疗重型颅脑损伤(sTBI)的可能作用机制。方法 将90只SD大鼠随机分为正常组、假手术组、模型组、金双歧组、小承气汤组,每组18只。模型组、金双歧组、小承气汤组大鼠采用Freeney's自由落体法制作sTBI大鼠模型,造模成功6h后,金双歧组、小承气汤组分别给予金双歧6.17 g/kg和小承气汤2.78 g/kg灌胃干预,正常组、假手术组、模型组给予2.78 ml/(kg·d)生理盐水灌胃。干预7d后观察大鼠神经功能缺损(NSS)评分,HE染色观察脑、结肠组织病理改变,16S rRNA测序技术分析大鼠结肠菌群的变化,蛋白质免疫印迹法检测大鼠脑、结肠组织白细胞介素1 β (IL-1 β)表达,酶联免疫吸附试验检测血清IL-1 β 含量。结果 假手术组与正常组各指标差异均无统计学意义($P>0.05$)。与正常组比较,模型组大鼠体重下降、NSS评分升高($P<0.01$)。HE染色显示,模型组大鼠神经细胞排列紊乱,大量神经元坏死,散在存活神经细胞肿胀、间质疏松,结肠黏膜完整性破坏、肠腺排列紊乱、肠间隙增宽、黏膜水肿,脑、结肠组织和血清IL-1 β 水平升高($P<0.01$),模型组大鼠肠道菌群多样性香农(Shannon)和辛普森(Simpson)指数下降,厚壁菌门、螺旋体门相对丰度下降,拟杆菌门、变形菌门、迷踪菌门、放线菌门、广古菌门相对丰度升高,毛螺科、瘤胃菌科、拟杆菌科_S24-7_组、螺旋体科相对丰度明显下降,拟杆菌科、迷踪菌科、肠杆菌科、产碱杆菌科相对丰度上升,毛螺科_NK4A136_组、毛螺科_UCG-005、罗姆布茨菌属、罗氏菌属、普雷沃氏菌_NK3B31_组、普雷沃氏菌_UCG-001、异普雷沃氏菌属、螺旋体_2相对丰度明显下降,拟杆菌属、埃希志贺菌、副拟杆菌属、迷踪门菌属相对丰度上升($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,小承气汤组和金双歧组大鼠体重升高、NSS评分下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$),脑和结肠组织病理改变减轻,脑、结肠组织和血清IL-1 β 水平均显著下降($P<0.01$),小承气汤组较金双歧组血清IL-1 β 下降程度更显著($P<0.05$)。与模型组比较,小承气汤组肠道菌群Shannon、Observed_species指数上升($P<0.01$),除了广古菌门、拟杆菌科_S24-7_组、普雷沃氏_UCG-001无明显变化之外,小承气汤逆转了模型组中发生改变菌群的相对丰度变化趋势($P<0.05$)。结论 小承气汤可以改善sTBI模型大鼠肠道菌群失调,促进产短链脂肪酸等有益菌生长,抑制产内毒素有害菌,减轻继发炎症反应,这可能是其治疗sTBI的作用机制之一。

[关键词] 重型颅脑损伤; 小承气汤; 肠道菌群; 炎症反应

根据病情严重程度,颅脑损伤被分为轻型、中型、重型和特重型四类,其中重型颅脑损伤(severe traumatic brain injury, sTBI)是最严重的类型之一,也是引起儿童和青壮年致死、致残最常见的一种创伤性疾病^[1]。sTBI引起的脑损伤包括原发

性损伤和继发性损伤两个阶段^[2]。原发性损伤发生在受伤的瞬间,是不可逆的,而减轻继发性损伤是改善sTBI所致神经功能障碍的关键^[3]。然而,目前临床上针对sTBI的有效治疗措施非常有限^[4]。临床资料显示,sTBI急性期多出现不同程度意识障碍、发热、腹胀、大便结等临床表现,可归属于中医学阳明腑实证范畴^[5-7]。小承气汤是阳明腑实证的主方之一,我们前期研究结果^[8]显示,小承气

基金项目:广西壮族自治区卫生厅中医药科技专项(GZLC14-29);广西名中医传承工作室项目(2017-2);广西中医药大学博士研究生科研创新项目(bs004)

✉ 通讯作者:hgh8828@163.com

汤能够减轻 sTBI 大鼠急性期脑水肿, 其机制可能是通过抑制炎症因子, 从而减轻 sTBI 继发炎症反应有关。肠道菌群是寄居于宿主肠道内并与宿主共生的多种微生物群落的总称, 参与维持宿主的肠道微生态平衡, 对机体消化吸收、能量代谢和免疫等诸多方面起着重要的调节作用^[9]。既往研究提示, 肠道菌群失衡产生一些毒素和炎症因子, 直接引发疾病, 并影响疾病的发展进程^[10]。已有研究发现, sTBI 急性期肠道菌群明显失调, 这些失调可能直接加重炎症反应, 影响 sTBI 的发展进程^[11]。因此, 本实验观察小承气汤对 sTBI 急性期模型大鼠肠道菌群、炎症因子水平的影响, 为小承气汤的临床应用提供依据。本实验经广西医科大学第一附属医院医学动物伦理委员会批准 [批号: 伦理 (2019-KY-E-155)]。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 90 只, 体质量 (250±20)g, 5~7 周龄, 由广西医科大学实验动物中心提供, 实验动物合格证号: SCXK (桂) 2019-0003。于室内温度 22~26℃、相对湿度 50%~70% 环境下普通饲料喂养。

1.2 药品

小承气汤组成: 酒大黄 12 g (批号: 20071313)、厚朴 6 g (批号: 20071483)、枳实 9 g (批号: 19121133), 免煎颗粒购于江苏江阴天江药业有限公司, 配制成含生药 1 g/ml 的药液, 分装冷藏备用。金双歧 (双歧杆菌三联活菌片, 0.5 g/片, 批号: 国药准字 S19980004), 内蒙古双奇药业股份有限公司。

1.3 主要试剂及仪器

白细胞介素 1β (IL-1β) 大鼠酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技有限公司, 货号: E-EL-R0012c); 抗体 IL-1β (Abcam 公司, 货号: ab254360); KIT5920MaxVision™2 检测试剂盒 (批号: 1904295920)、KIT-9706 即用型免疫组化 UltraSensitive™SP 试剂盒 (批号: 2108029706G), 福州迈斯生物技术开发有限公司; 异氟烷 (深圳市瑞沃德生命科技有限公司, 货号: 902-0000-522); RIPA 裂解液 (中国 Beyotime 公司, 货号: P0013B); 4% 多聚甲醛 (成都市科隆化学有限公司, 批号: 2019121201); 苏木素-伊红 (HE) 染液 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 货

号: G6004); Agarose 琼脂糖 (货号: RT101)、粪便基因组 DNA 提取试剂盒 (货号: DP328), 深圳天根生化科技有限公司; Phusion High-Fidelity PCR Master Mix with GC 缓冲液 (货号: F532S)、GeneJET 凝胶回收试剂盒 (货号: K0692), 美国 Thermo Scientific 公司; TruSeq DNA PCR-Free Sample Preparation 试剂盒 (货号: FC-121-3003)、NovaSeq 6000 S4 逆转录试剂盒 (货号: 20012866), 美国 Illumina 公司。

全波长酶标仪 (美国 Biotek 公司, 型号 Epoch); 高速冷冻离心机 (美国 Thermo 公司, 型号 FRESCO 21); 光学显微镜 (日本 OLYMPUS 公司, 型号 CX21); 石蜡切片机 (型号 RM2235)、病理图像分析仪 (型号 DMR+Q550), 德国 Leica 公司; 电泳仪 (型号 PowerPac Basic)、蛋白转印模块 (型号 Mini Trans-Blot Cell)、PCR 仪 (型号 T100), 美国 Bio-Rad 公司; 凝胶成像系统 (上海天能科技有限公司, 型号 Tanon 5200); 脑立体定位仪 (深圳瑞沃德生命科技有限公司, 型号 68028); 测序仪 (美国 Illumina 公司, 型号 Illumina NovaSeq 6000); 电子天平 (浙江凯丰集团有限公司, 型号 JOS-1000)。

1.4 分组及造模

90 只雄性 SD 大鼠适应性饲养 1 周后, 按随机数字表法分为正常组、假手术组、模型组、金双歧组、小承气汤组, 每组 18 只。模型组、金双歧组、小承气汤组大鼠采用改良 Freney's 自由落体法制备 sTBI 大鼠模型^[12]。大鼠术前禁食 12 h, 吸入异氟烷麻醉 (诱导浓度 4%, 维持浓度 2%) 后将大鼠头部固定在脑立体定位仪上, 头部备皮、消毒, 沿中线纵向切开头皮, 暴露右侧顶骨, 钻开颅骨形成直径 5 mm 的圆形颅窗 (矢状缝右侧 2.5 mm、冠状缝后 1.5 mm), 保持硬脑膜完整。将圆形金属板放在硬膜外, 由失重撞击装置 (50 g 砝码, 高 25 cm、直径 5 mm 的圆柱体) 自由落下打击造成右侧顶叶脑挫伤, 骨蜡填充, 缝合头皮。假手术组只开颅不打击致伤。造模 6 h 后大鼠神经功能缺损评分 (NSS 评分) >2 分, 表明模型成功^[13]。

1.5 给药方法

造模成功后, 参照《药理实验方法学》^[14] 中公式计算大鼠的临床等效剂量, 金双歧组和小承气汤组分别给予相应药物 6.17 g/(kg·d) 和 2.78 g/(kg·d) 灌胃, 正常组、假手术组和模型组分别给予 2.78 ml/(kg·d) 生理盐水灌胃, 每日 1 次, 连续 7 d。

1.6 观察指标与方法

1.6.1 大鼠一般情况 每天观察大鼠的饮食、饮水、粪便、被毛、活动状态情况，并详细记录出现腹胀、大便干结或便秘、精神神经症状，药物干预 7 d 后比较各组大鼠体重。

1.6.2 大鼠 NSS 评分测定 药物干预 7 d 后，采用 NSS 评分方法^[13]，评估各组大鼠神经功能缺损症状。NSS 总分 10 分，评分越高表示大鼠神经损伤越严重。

1.6.3 脑和结肠组织病理观察 NSS 评分后，各组大鼠采用随机数字表法取 6 只进行脑和结肠组织病理观察，另取 6 只进行 16S rRNA 测序分析大鼠肠道菌群变化，剩余 6 只采用 Western blotting 法检测脑和结肠组织 IL-1 β 蛋白表达及 ELISA 法测定血清炎症因子 IL-1 β 含量。

大鼠吸入 4% 异氟烷麻醉后，依次用 0.9% 氯化钠注射液 250 ml、4% 多聚甲醛 150 ml 经心尖灌注后取全脑和升结肠组织，置 4% 多聚甲醛固定 24 h，石蜡包埋、切片、脱蜡、HE 染色、脱水封片，光学显微镜观察组织病理改变。

1.6.4 16S rRNA 测序分析大鼠肠道菌群变化 大鼠麻醉后取结肠内容物，采用 16S rRNA 基因测序，经 DNA 提取、PCR 扩增纯化、Illumina 测序及序列数据质控，获取细菌 DNA 的 V3~V4 可变区碱基序列信息，按最小样本序列数对结果进行优化，以获得有效的操作分类单元 (OTU) 数目及相应的丰度信息。通过与 SILVA 数据库 (<http://www.arb-silva.de/>) 进行比对，对 OTU 进行物种分类注释 (包括门科属)。利用 QIIME1.7.0 软件计算样品物种艾森 (ACE)、赵氏 (Chao1)、香农 (Shannon)、辛普森 (Simpson) 和 Observed_species 指数，分析物种 Alpha 多样性，其中 ACE、Chao1 和 Observed_species 指数估计样品中 OTU 数目，反应菌群的丰富度，其值越大，样品群落丰富度越高；Shannon 和 Simpson 指数反应菌群多样性，其值越大，说明群落多样性越高。使用 R 软件 (Version 2.15.3) 绘制主坐标分析图 (PCoA) 进行 Beta 多样性分析，比较组间样本微生物群落构成差异。组间差异菌群分析采用 Metastats 分析，使用 R 软件对各分类水平下菌群，做组间的排列检验。

1.6.5 Western blotting 法检测脑和结肠组织 IL-1 β 蛋白表达 大鼠麻醉后立即取损伤侧脑皮质和结肠组织，加入 RIPA 裂解液提取蛋白，用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 分离蛋白，电

泳后转移到硝酸纤维素膜上，与 IL-1 β (1:500) 一抗共同孵育，37℃ 下反应 1 h 后 4℃ 过夜。分别加入过氧化物酶标记的相应二抗 (1:2000)，脱色摇床 1 h，PBS 洗 3 次，每次 5 min。二氨基联苯胺 (DAB) 显色，凝胶成像系统成像拍照分析。Image J 1.52a 图像分析软件测定灰度值，以 β -肌动蛋白 (β -actin) 作为内参，计算蛋白相对表达量。

1.6.6 ELISA 法测定血清炎症因子 IL-1 β 含量 大鼠经腹主动脉采血，常温静置 30 min，于 4℃、4000 r/min (离心半径 85 mm) 离心 10 min，取上清液，-80℃ 保存待测。按照 ELISA 试剂盒说明书步骤测定血清 IL-1 β 含量。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 26.0 统计软件分析数据，GraphPad Prism 6.0 软件绘制统计图。本研究计量资料符合正态分布以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示，多组间比较方差齐用单因素方差分析，两两比较采用 LSD-*t* 检验，方差不齐时采用 Dunnett *T*³ 检验。采用 MetaStats 分析肠道差异菌群。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较

正常组和假手术组大鼠饮水、饮食、背毛及大便正常，体重逐渐增长；模型组大鼠饮水及饮食减少，背毛粗糙，大多出现腹胀、大便不通或干结，甚至躁动的情况，大鼠体重明显下降；小承气汤组和金双歧组大鼠与模型组比较上述症状较轻，体重增加，两组之间无明显差异。

表 1 示，正常组与假手术组大鼠体重比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。除假手术组外，其余各组大鼠均较正常组大鼠体重轻 ($P<0.01$)。与模型组比较，小承气汤组和金双歧组大鼠体重增加 ($P<0.05$)。小承气汤组和金双歧组大鼠体重差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 1 各组大鼠体重及 NSS 评分比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	体重/g	NSS 评分/分
正常组	18	255.61 $\pm$ 9.24	0
假手术组	18	253.50 $\pm$ 7.96	0
模型组	18	232.78 $\pm$ 8.10 ^{a)}	5.89 $\pm$ 0.83 ^{a)}
金双歧组	18	240.78 $\pm$ 9.18 ^{a) b)}	4.72 $\pm$ 1.13 ^{a) c)}
小承气汤组	18	238.89 $\pm$ 5.37 ^{a) b)}	4.56 $\pm$ 1.20 ^{a) c)}

注：NSS 评分，神经功能缺损评分。

a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

2.2 各组大鼠 NSS 评分比较

表 1 示，正常组和假手术组大鼠无神经功能缺

损症状。除假手术组外，其余各组大鼠较正常组 NSS 评分升高 ($P<0.01$)。与模型组比较，小承气汤组和金双歧组大鼠 NSS 评分均明显下降 ($P<0.01$)。小承气汤组和金双歧组大鼠 NSS 评分组间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

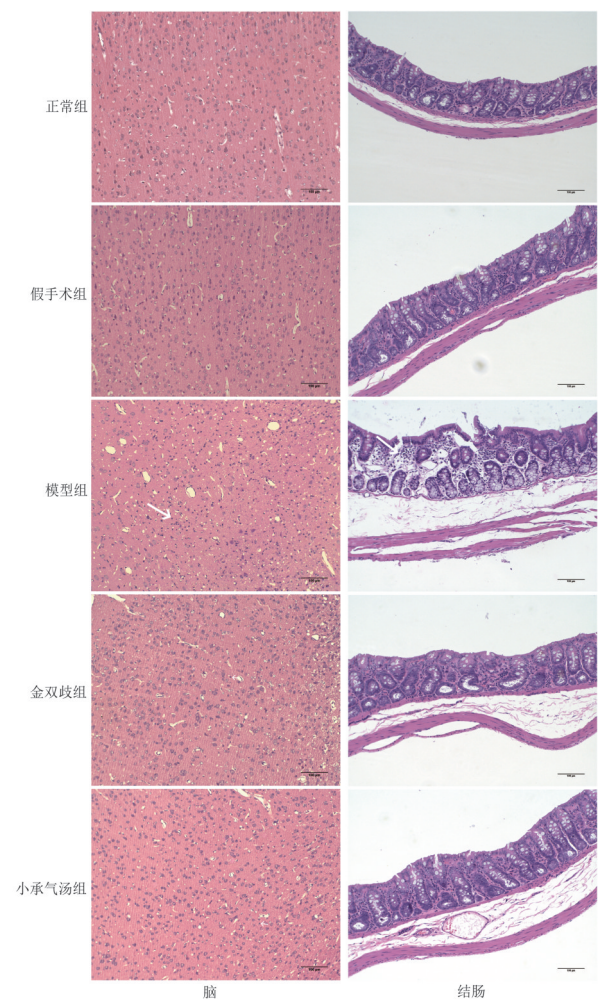
2.3 各组大鼠脑组织和结肠组织病理学改变

光镜下观察，正常组、假手术组大鼠脑神经细胞排列有序，神经元形态结构正常，胞浆、胞核结构清晰，染色均匀，无出血、水肿及炎细胞浸润。模型组大鼠神经细胞排列紊乱，形态异常，大量神经元坏死，核固缩，散在存活的神细胞肿胀，间质疏松。小承气汤组和金双歧组大鼠上述病理改变减轻，神经细胞排列相对规整，正常神经细胞增多，间质水肿减轻，两组间无明显差异，详见图1(扫描本文二维码获取彩图)。

正常组和假手术组大鼠结肠组织各层结构清晰，肠腺排列规整，黏膜完好。模型组大鼠结肠黏膜不完整，少许上皮细胞脱落，肠腺排列不规则，肠腺间距增宽，黏膜层和黏膜下层水肿，可见少许炎细胞浸润。与模型组比较，小承气汤组和金双歧组肠黏膜较完整，上皮细胞无脱落，黏膜水肿减轻，未见明显炎细胞，可见少许淋巴细胞浸润，两组间无明显差异。

2.4 各组大鼠肠道菌群Alpha多样性分析结果

各组大鼠共有 OTU 数 1031 个，其中小承气汤组特有 OTU (223 个) 最多，其次是金双歧组 (183 个) 和假手术组 (147 个)，正常组最少 (97 个)。Alpha 多样性分析反应单个样品的结构差异，本研究对不同样品在 97% 一致性阈值下的 Alpha 多样性指数进行统计分析。表 2 示，正常组和假手术组大鼠肠道菌群各指标差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与正常组比较，模型组 Shannon 和 Simpson 指数下降 ($P<0.01$)，Observed_species、ACE 和 Chao1 指数差异无统计学意义 ($P>0.05$)；与模型组比较，小承气汤组 Shannon、Observed_species 指



注：脑组织病理图中，白色箭头表示神经细胞核固缩；结肠组织病理图中，白色箭头表示肠腺排列紊乱，肠间隙增宽，黏膜水肿。

图1 各组大鼠脑组织和结肠组织病理学改变光镜下观察结果 (HE 染色，×200)

数明显升高 ($P<0.01$)，Simpson、ACE 和 Chao1 指数变化差异无统计学意义 ($P>0.05$)，金双歧组各指标差异无统计学意义 ($P>0.05$)。小承气汤组 Shannon 指数显著高于金双歧组 ($P<0.05$)。

2.5 各组大鼠肠道菌群Beta多样性分析结果

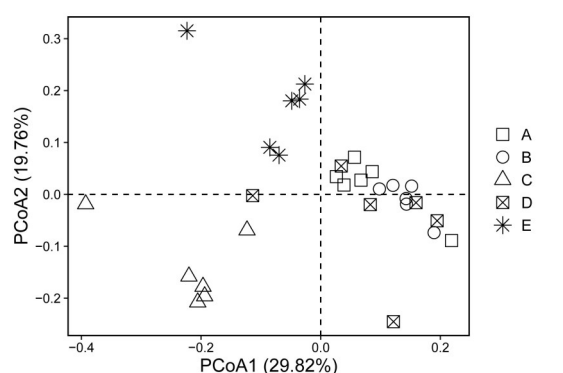
Beta 多样性分析反映不同组间样品群落结构的相似性。本研究通过 PCoA 图来展示。两组符号距

表2 各组大鼠肠道菌群Alpha多样性指数比较 (x̄±s)

组别	鼠数	ACE	Chao1	Observed_species	Shannon	Simpson
正常组	6	1097.15±57.26	1116.94±92.00	935.00±33.20	6.88±0.12	0.98±0.01
假手术组	6	1149.78±159.09	1166.56±179.39	967.50±111.69	7.10±0.32	0.98±0.01
模型组	6	1100.45±114.23	1101.68±111.88	898.17±59.04	6.12±0.27 ^{a)}	0.96±0.01 ^{a)}
金双歧组	6	1113.38±145.27	1118.97±132.79	921.00±102.96	6.29±0.19	0.95±0.02
小承气汤组	6	1190.50±134.07	1169.69±136.67	1023.33±84.0 ^{b)}	6.62±0.35 ^{b) c)}	0.96±0.01

注：ACE，艾森；Chao1，赵氏；Shannon，香农；Simpson，辛普森。
a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与金双歧组比较， $P<0.05$ 。

离越近,物种组成结构相似度越高;距离越远,其相似度越低。图2示,假手术组与正常组样间距接近,菌群结构相似度高;模型组与正常组距离较远,菌群结构明显不同;小承气汤组和金双歧组菌群变化趋势向正常组靠近。



注: PCoA1, 主成分1; PCoA2, 主成分2; A, 正常组; B, 假手术组; C, 模型组; D, 金双歧组; E, 小承气汤组。

图2 各组大鼠肠道菌群Beta多样性分析PCoA图

2.6 各组大鼠肠道菌群差异性分析结果

基于16S rRNA测序获取的OTU丰度及注释信息,分别选取门、科(丰度排名前10)及属水平(丰度排名前15)进行统计分析。表3、表4、表5示,正常组和假手术组在门、科、属分类水平上,大鼠的肠道菌群结构差异无统计学意义($P>0.05$)。

门分类水平上,各组蓝藻菌门、软壁菌门、脱铁杆菌门相对丰度差异均无统计学意义($P>0.05$)。与正常组比较,模型组厚壁菌门、螺旋体门相对丰度下降,拟杆菌门、变形菌门、迷踪菌门、放线菌门、广古菌门相对丰度升高($P<0.05$);与模型组比较,除广古菌门外,小承气汤组逆转了上述菌群丰度变化趋势($P<0.05$);与模型组比较,金双歧组广古菌门、变形菌门、放线菌门相对丰度变化差异无统计学意义($P>0.05$),其余菌群丰度变化与模型组比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。与金双歧组比较,小承气汤组迷踪菌门、广古菌门相对丰度升高($P<0.05$)。

表3 大鼠肠道菌群门水平相对丰度在各组间比较(丰度排名前10)

(%, $\bar{x} \pm s$)

菌群	鼠数	正常组	假手术组	模型组	金双歧组	小承气汤组
厚壁菌门	6	0.556±0.019	0.596±0.004	0.243±0.030 ^{a)}	0.506±0.055 ^{b)}	0.442±0.021 ^{b)}
拟杆菌门	6	0.355±0.032	0.314±0.002	0.471±0.027 ^{a)}	0.324±0.041 ^{b)}	0.388±0.011 ^{b)}
变形菌门	6	0.021±0.005	0.021±0.000	0.151±0.033 ^{a)}	0.073±0.041	0.026±0.006 ^{b)}
迷踪菌门	6	0.001±0.000	0.001±0.002	0.089±0.020 ^{a)}	0.001±0.001 ^{b)}	0.017±0.006 ^{b) c)}
螺旋体门	6	0.052±0.013	0.052±0.030	0.002±0.001 ^{a)}	0.072±0.032 ^{b)}	0.053±0.018 ^{b)}
放线菌门	6	0.0005±0.0001	0.001±0.000	0.001±0.0004 ^{a)}	0.001±0.001	0.0004±0.0001 ^{b)}
广古菌门	6	0.0002±0.0001	0.0002±0.0001	0.002±0.001 ^{a)}	0.00007±0.00004	0.003±0.000 ^{c)}
蓝藻菌门	6	0.007±0.002	0.004±0.003	0.136±0.006	0.006±0.003	0.035±0.014
软壁菌门	6	0.003±0.000	0.004±0.001	0.002±0.000	0.007±0.005	0.004±0.001
脱铁杆菌门	6	0.002±0.001	0.001±0.000	0.001±0.000	0.003±0.002	0.001±0.000

注: 由于部分数据数值太小,故小数点后保留至有具体数据的位数。

a) 与正常组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与金双歧组比较, $P<0.05$ 。

表4 大鼠肠道菌群科水平相对丰度在各组间差异比较(丰度排名前10)

(%, $\bar{x} \pm s$)

菌群	鼠数	正常组	假手术组	模型组	金双歧组	小承气汤组
毛螺科	6	0.356±0.024	0.376±0.023	0.098±0.011 ^{a)}	0.275±0.050 ^{b)}	0.262±0.028 ^{b)}
乳杆菌科	6	0.044±0.015	0.063±0.009	0.015±0.012	0.067±0.024	0.013±0.004
瘤胃菌科	6	0.108±0.013	0.111±0.013	0.075±0.008 ^{a)}	0.095±0.017	0.122±0.013 ^{b)}
普雷沃氏菌科	6	0.192±0.031	0.136±0.016	0.142±0.027	0.179±0.039	0.279±0.014 ^{b) c)}
螺旋体科	6	0.052±0.013	0.052±0.030	0.002±0.001 ^{a)}	0.072±0.032 ^{b)}	0.053±0.018 ^{b)}
拟杆菌科_S24-7_组	6	0.151±0.023	0.170±0.013	0.077±0.017 ^{a)}	0.128±0.013 ^{b)}	0.088±0.020
拟杆菌科	6	0.005±0.001	0.003±0.001	0.205±0.037 ^{a)}	0.013±0.008 ^{b)}	0.013±0.003 ^{b)}
迷踪菌科	6	0.001±0.000	0.002±0.001	0.089±0.020 ^{a)}	0.001±0.001 ^{b)}	0.017±0.006 ^{b)}
肠杆菌科	6	0.001±0.000	0.0005±0.0003	0.097±0.022 ^{a)}	0.046±0.044	0.002±0.001 ^{b)}
产碱杆菌科	6	0.001±0.000	0.001±0.000	0.029±0.002 ^{a)}	0.003±0.002 ^{b)}	0.001±0.000 ^{b)}

注: 由于部分数据数值太小,故小数点后保留至有具体数据的位数。

a) 与正常组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与金双歧组比较, $P<0.05$ 。

表5 大鼠肠道菌群属水平丰度差异在各组间比较（丰度排名前15）（%， $\bar{x}\pm s$ ）

菌群	鼠数	正常组	假手术组	模型组	金双歧组	小承气汤组
毛螺科_NK4A136_组	6	0.153±0.039	0.207±0.019	0.028±0.004 ^{a)}	0.121±0.028 ^{b)}	0.149±0.020 ^{b)}
毛螺科_UCG-005	6	0.137±0.008	0.009±0.002	0.001±0.000 ^{a)}	0.029±0.025	0.009±0.002 ^{b)}
乳杆菌属	6	0.044±0.017	0.063±0.009	0.015±0.012	0.067±0.024 ^{b)}	0.013±0.004 ^{c)}
异普雷沃氏菌属	6	0.069±0.018	0.029±0.008	0.018±0.015 ^{a)}	0.048±0.027 ^{b)}	0.094±0.031 ^{b)}
普雷沃氏菌_Ga6A1_组	6	0.016±0.008	0.012±0.006	0.016±0.005	0.022±0.005	0.039±0.029
普雷沃氏菌_1	6	0.014±0.012	0.006±0.005	0.005±0.004	0.001±0.000	0.017±0.015
普雷沃氏菌_NK3B31_组	6	0.024±0.000	0.012±0.002	0.006±0.001 ^{a)}	0.016±0.000 ^{b)}	0.027±0.007 ^{b)}
普雷沃氏菌_UCG-001	6	0.009±0.002	0.010±0.002	0.002±0.001 ^{a)}	0.009±0.004	0.003±0.001
螺旋体_2	6	0.052±0.013	0.052±0.030	0.002±0.001 ^{a)}	0.072±0.035 ^{b)}	0.053±0.018 ^{b)}
罗姆布茨菌属	6	0.004±0.001	0.003±0.000	0.001±0.000 ^{a)}	0.011±0.008	0.003±0.001 ^{b)}
罗氏菌属	6	0.012±0.005	0.005±0.002	0.0005±0.0002 ^{a)}	0.006±0.004	0.005±0.000 ^{b)}
拟杆菌属	6	0.005±0.001	0.003±0.001	0.205±0.037 ^{a)}	0.013±0.008 ^{b)}	0.013±0.003 ^{b)}
埃希志贺菌属	6	0.001±0.000	0.0004±0.0008	0.092±0.021 ^{a)}	0.045±0.043	0.002±0.000 ^{b)}
迷踪菌属	6	0.001±0.000	0.002±0.001	0.089±0.020 ^{a)}	0.001±0.000 ^{b)}	0.017±0.006 ^{b)}
副杆菌属	6	0.001±0.000	0.001±0.000	0.028±0.007 ^{a)}	0.002±0.000 ^{b)}	0.003±0.001 ^{b)}

注：由于部分数据数值太小，故小数点后保留至有具体数据的位数。
a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与金双歧组比较， $P<0.05$ 。

科分类水平上，与正常组比较，模型组毛螺科、瘤胃菌科、拟杆菌科_S24-7_组和螺旋体科丰度下降，拟杆菌科、迷踪菌科、肠杆菌科和产碱杆菌科相对丰度显著上升（ $P<0.05$ ）。与模型组比较，小承气汤组毛螺科、瘤胃菌科、普雷沃氏菌科、螺旋体科、拟杆菌科、迷踪菌科、产碱杆菌科、肠杆菌科差异有统计学意义（ $P<0.05$ ），拟杆菌科_S24-7_组和乳杆菌科差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。与模型组比较，金双歧组肠杆菌科、瘤胃球菌科、普雷沃氏菌科、乳杆菌科无明显变化（ $P>0.05$ ），毛螺科、螺旋体科、拟杆菌科_S24-7_组、拟杆菌科、迷踪菌科、产碱杆菌科相对丰度差异具有统计学意义（ $P<0.05$ ）。与金双歧组比较，小承气汤组普雷沃氏菌科相对丰度升高（ $P<0.05$ ）。

属分类水平上，与正常组比较，模型组毛螺科_NK4A136_组、毛螺科_UCG-005、普雷沃氏菌_NK3B31_组、普雷沃氏_UCG-001、异普雷沃氏菌属、罗姆布茨菌属、罗氏菌属、螺旋体_2、拟杆菌属、埃希志贺菌属、副杆菌属、迷踪菌属相对丰度差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）。与模型组比较，小承气汤组除乳杆菌属、普雷沃氏菌_Ga6A1_组、普雷沃氏菌_1、普雷沃氏菌_UCG-001外，其余各菌群相对丰度差异均有统计学意义（ $P<0.05$ ）；而金双歧组仅毛螺科_NK4A136_组、乳杆菌属、异普雷沃氏菌属、普雷沃氏_NK3B31_组、螺旋体_2、拟杆菌属、副杆菌属、迷踪菌属相对丰度差异有

统计学意义（ $P<0.05$ ）。与金双歧组比较，小承气汤组乳酸杆菌相对丰度降低（ $P<0.05$ ）。

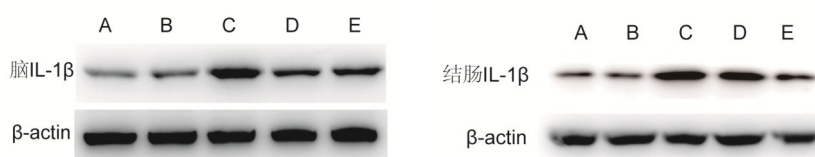
2.7 各组大鼠脑、结肠组织IL-1β蛋白表达及血清IL-1β含量比较

表6示，正常组与假手术组大鼠脑组织、结肠组织IL-1β蛋白表达及血清IL-1β含量比较差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。与正常组比较，模型组大鼠脑、结肠组织IL-1β蛋白表达及血清IL-1β含量升高（ $P<0.01$ ）。与模型组比较，小承气汤和金双歧组大鼠脑、结肠组织IL-1β蛋白表达及血清IL-1β含量下降（ $P<0.01$ ）。小承气汤和金双歧组比较，脑、结肠组织IL-1β蛋白表达差异无统计学意义（ $P>0.05$ ），血清IL-1β水平低于小承气汤组（ $P<0.05$ ）。各组大鼠脑和结肠组织IL-1β蛋白电泳图见图3。

表6 各组大鼠脑组织、结肠组织IL-1β蛋白表达及血清IL-1β含量比较（ $\bar{x}\pm s$ ）

组别	鼠数	脑IL-1β/ β-actin	结肠IL-1β/ β-actin	血清IL-1β/ pg·ml ⁻¹
正常组	6	0.51±0.23	0.44±0.19	40.30±2.67
假手术组	6	0.57±0.18	0.47±0.22	43.47±3.15
模型组	6	1.34±0.33 ^{a)}	1.31±0.17 ^{a)}	125.07±6.25 ^{a)}
金双歧组	6	0.91±0.18 ^{a)b)}	0.94±0.14 ^{a)b)}	95.46±1.89 ^{a)b)}
小承气汤组	6	0.85±0.12 ^{a)b)}	0.82±0.17 ^{a)b)}	74.53±1.73 ^{a)b)c)}

注：IL-1β，白细胞介素1β。
a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；
c) 与金双歧组比较， $P<0.05$ 。



注: IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; A, 正常组; B, 假手术组; C, 模型组; D, 金双歧组; E, 小承气汤组。

图3 各组大鼠脑和结肠组织 IL-1 β 蛋白电泳图

3 讨论

sTBI 属于中医学“头部内伤”范畴。脑部直接受外力暴击, 脉络破损, 营血离经, 积血成瘀。气血逆乱, 气机升降失常, 继而变生热、痰之邪, 故 sTBI 急性期以瘀、热、痰等互结之实邪蒙蔽清窍为主^[15]。然阳明多气多血, 脑部受创, 气血逆乱, 阳明受累, 通降失司, 传化失常, 热、瘀等实邪与肠中糟粕相搏, 形成燥屎内结, 出现腹胀、便秘、发热、烦躁、谵语等阳明腑实证证候。小承气汤源自《伤寒论》, 是阳明腑实证代表方之一, 方中大黄泻热通腑、活血化瘀, 枳实理气消痞; 厚朴行气除满。三药合用, 以泻阳明之燥结, 涤阳明之瘀热, 调阳明之气血。清阳明而治脑窍, 取上病治下, 釜底抽薪之意。

颅脑损伤引起肠道菌群改变已有一些研究报道^[16-17]。本研究从细菌门、科、属水平观察 sTBI 大鼠急性期的肠道菌群变化。结果发现, 与正常组比较, 假手术组大鼠肠道菌群无明显变化, 这排除了麻醉、皮肤切开及缝合等其他因素对 sTBI 大鼠肠道菌群的影响。模型组大鼠肠道菌群发生明显变化。Alpha 多样性 Shannon 和 Simpson 指数下降, 提示 sTBI 大鼠肠道菌群多样性降低。Beta 多样性 PCoA 分析表明, sTBI 大鼠与正常大鼠菌群结构存在明显差异。进一步统计分析发现, sTBI 大鼠肠道菌群丰度发生改变。Nicholson 等^[17]相关研究报道与本研究结果比较, 门科水平上大部分菌群变化趋势相似, 但不同的是迷踪菌门明显上升, 而乳杆菌科无明显变化, 其原因有待进一步研究。厚壁菌门和拟杆菌门是机体能量代谢和营养吸收的主要细菌。厚壁菌门/拟杆菌门 (F/B) 值可反应胃肠整体健康状况, F/B 值下降可导致营养吸收障碍, 出现营养不良^[18]。本研究中, sTBI 模型大鼠在出现严重的神经功能缺损症状时, 也出现腹胀、大便结、体重下降等胃肠功能障碍表现, 这可能与 sTBI 后肠道菌群紊乱、肠道 F/B 比值下降有关。毛螺科、瘤胃球菌科、普雷沃氏菌科及其属水平多种细菌是

短链脂肪酸 (SCFAs) 产生菌^[19-20]。SCFAs 是肠道细菌主要代谢产物, 参与维持肠道稳态^[21]; 同时也通过影响小胶质细胞形态和功能成熟, 调节中枢神经炎症^[22]。肠道菌群失调, 导致 SCFAs 产生减少, 促进炎症因子分泌, 启动机体免疫炎症反应, 对中枢神经系统产生神经毒性作用^[20]。研究报道, 短链脂肪酸丁酸可减轻 sTBI 小鼠模型急性期脑水肿和血脑屏障通透性, 改善小鼠的神经功能缺损症状^[23]。本研究模型组中这些产 SCFAs 有益菌丰度显著下降, 可能导致肠道 SCFAs 减少, 加重 sTBI 继发性炎症反应。当微生态平衡被破坏, 革兰氏阴性菌 (G⁻) 数量及种类显著升高, 可通过裂解细胞壁, 释放脂多糖 (LPS) 引起局部和全身的炎症反应^[24]。Hang 等^[25]研究发现, 腹腔注射 LPS 会加重颅脑损伤大鼠急性期脑内炎症反应及脑损伤。本研究发现, 模型组中肠道 G⁻ 致病菌拟杆菌门和变形菌门, 主要是拟杆菌属、产碱杆菌科、肠杆菌科、埃希志贺菌属显著增加。这可能导致 LPS 增多, 继而诱发或加重 sTBI 继发性炎症反应。本研究还通过 HE 染色镜下观察到 sTBI 大鼠脑神经细胞肿胀、核固缩和间质水肿, 结肠肠腺排列紊乱、肠黏膜水肿和炎细胞浸润等病理改变。脑、结肠、血清 IL-1 β 水平较正常组显著升高, 这些结果提示 sTBI 后, 伴随着脑组织的炎症、水肿等病理的发生, 引起肠道炎症病变。

本研究结果发现, 与模型组比较, 小承气汤干预后 sTBI 大鼠肠道菌群多样性增加, 菌群结构异常改变得到改善。除了广古菌门、普雷沃氏 UCG-001 和拟杆菌科_S24-7_组无明显变化之外, 小承气汤逆转了模型组中异常改变菌群的相对丰度变化趋势。具体表现为: 厚壁菌门丰度增加, 拟杆菌门和变形门下降; 毛螺科、瘤胃菌科及普雷沃氏菌科等产 SCFAs 的有益菌增加; 埃希志贺菌属、拟杆菌属等 G⁻ 致病菌减少。金双歧干预后, 肠道菌群多样性无明显变化, 但菌群结构异常改变得到改善。小承气汤与金双歧组比较, 两组均能不同程度改善 sTBI 大鼠肠道菌群失调状况。小承气汤具有两个优

势,一是增加了肠道菌群的多样性,二是抑制了 G⁻ 致病菌变形菌门、肠杆菌科和埃希志贺菌属生长。小承气汤药理成分并没有金双歧等细菌活性成分,其改善肠道菌群失调,可能不是直接补充肠道菌种,而是通过其他途径调节影响到肠道菌群。实验中亦发现,小承气汤及金双歧干预后,随着肠道菌群失衡的改善,脑和结肠组织水肿、炎症等病理减轻,脑、结肠组织和血清 IL-1 β 表达明显下降, sTBI 大鼠的神经功能缺损症状及胃肠道症状得到改善。这表明,小承气汤调节肠道菌群,同时能够减轻 sTBI 引起的肠道炎症,继而减轻脑内炎症,改善 sTBI 大鼠的神经功能和胃肠道症状。但与金双歧比较,小承气汤降低血清 IL-1 β 效果更明显,这一方面可能与其改善肠道菌群失调能力更强有关,另一方面可能是小承气汤的直接抗炎作用所致。

综上所述,小承气汤对 sTBI 大鼠肠道菌群紊乱具有调节作用,可促进产短链脂肪酸等有益菌生长,抑制产内毒素有害菌,减轻 sTBI 继发炎症反应,这可能是小承气汤治疗 sTBI 的作用机制之一。然而,肠道菌群的复杂性和多样性决定了其与宿主之间的交互影响作用存在差异、结构与功能之间存在一定距离。本研究未对菌群差异物种及其功能进行鉴定与验证,因此下一步我们将采用粪便移植等技术进一步研究小承气汤治疗 sTBI 的肠道机制。

参考文献

- [1] MAAS A, MENON DK, ADELSON PD, et al. Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research [J]. *Lancet Neurol*, 2017, 16(12): 987-1048.
- [2] GRANDHI R, BONFIELD CM, NEWMAN WC, et al. Surgical management of traumatic brain injury: a review of guidelines, pathophysiology, neurophysiology, outcomes, and controversies [J]. *J Neurosurg Sci*, 2014, 58(4): 249-259.
- [3] GAO C, QIAN Y, HUANG J, et al. A three-day consecutive fingolimod administration improves neurological functions and modulates multiple immune responses of CCI mice [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(10): 8348-8360.
- [4] XIONG LL, HU Y, ZHANG P, et al. Neural stem cell transplantation promotes functional recovery from traumatic brain injury via brain derived neurotrophic factor-mediated neuroplasticity [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(3): 2696-2711.
- [5] 杨万章, 张志兰, 刘金, 等. 颅脑损伤的中医辨证分型研究 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2010, 8(10): 1243-1245.
- [6] 谢天一, 沈锦, 农云凤, 等. 颅脑损伤中医证候的聚类分析研究 [J]. *时珍国医国药*, 2014, 25(5): 1267-1269.
- [7] 刘启华, 凌江红, 黄李平, 等. 中重型颅脑损伤中西医结合诊疗方案临床验证疗效分析 [J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(3): 637-640.
- [8] 彭玲玲, 王景博, 潘宇政, 等. 小承气汤对重型颅脑损伤大鼠急性期脑水肿及炎症因子的影响 [J]. *中华危重病急救医学*, 2021, 33(11): 1347-1352.
- [9] 李苗, 孙迪, 付冰冰, 等. 肠道菌群与自身免疫性疾病研究进展 [J]. *中国微生态学杂志*, 2015, 27(10): 1233-1237.
- [10] 陈玲玲, 陆文松, 廖水玉, 等. 黄连素对 2 型糖尿病患者血清炎症因子水平及肠道双歧杆菌的影响 [J]. *中医杂志*, 2016, 57(23): 2028-2031.
- [11] MA Y, LIU T, FU J, et al. *Lactobacillus acidophilus* exerts neuroprotective effects in mice with traumatic brain injury [J]. *J Nutr*, 2019, 149(9): 1543-1552.
- [12] FEENEY DM, BOYESON MG, LINN RT, et al. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat [J]. *Brain Res*, 1981, 211(1): 67-77.
- [13] 张均田. 现代药理实验方法 [M]. 2 版. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998: 1241.
- [14] 徐淑云, 卞如濂, 陈修, 等. 药理实验方法学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 1543-1545.
- [15] 凌江红, 黄李平, 黄熙, 等. 颅脑损伤中医诊疗方案 [J]. *中医杂志*, 2015, 56(10): 836-840.
- [16] ANGOA-PEREZ M, ZAGORAC B, ANNEKEN JH, et al. Repetitive, mild traumatic brain injury results in a progressive white matter pathology, cognitive deterioration, and a transient gut microbiota dysbiosis [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 8949.
- [17] NICHOLSON SE, WATTS LT, BIURMEISTER DM, et al. Moderate traumatic brain injury alters the gastrointestinal microbiome in a time-dependent manner [J]. *Shock*, 2019, 52(2): 240-248.
- [18] STOJANOV S, BERLEC A, STRUKELJ B. The influence of probiotics on the firmicutes/bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(11): 1715-1731.
- [19] ZHANG J, GUO Z, XUE Z, et al. A phylo-functional core of gut microbiota in healthy young Chinese cohorts across lifestyles, geography and ethnicities [J]. *ISME J*, 2015, 9(9): 1979-1990.
- [20] 陈欢. 帕金森病患者肠道菌群的多样性研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2017.
- [21] PARADA VD, DE LA FUENTE MK, LANDSKRON G, et al. Short chain fatty acids (SCFAs) -mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for

- inflammatory bowel diseases[J]. Front Immunol, 2019, 10:277. doi: 10.3389/fimmu.2019.00277.
- [22] MOSSAD O, ERNY D. The microbiota-microglia axis in central nervous system disorders [J]. Brain Pathol, 2020, 30(6):1159-1177.
- [23] LI H, SUN J, WANG F, et al. Sodium butyrate exerts neuroprotective effects by restoring the blood-brain barrier in traumatic brain injury mice[J]. Brain Res, 2016, 1642:70-78. doi: 10.1016/j.brainres.2016.03.031.
- [24] 刘雷蕾, 马淑然. 基于肠道菌群介导的炎性反应研究 黄芪多糖对结肠炎相关癌症的作用[J]. 世界中医药, 2021, 16(2):226-237.
- [25] HANG CH, SHI JX, TIAN J, et al. Effect of systemic LPS injection on cortical NF-kappaB activity and inflammatory response following traumatic brain injury in rats [J]. Brain Res, 2004, 1026(1):23-32.

Effects of *Xiaochengqi Decoction* (小承气汤) on Intestinal Flora in Rats with Acute Severe Traumatic Brain Injury

PENG Lingling^{1,2}, LIANG Renjiu¹, NING Ling³, DU Yiheng¹, HUANG Guihua¹

1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530020; 2. The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University; 3. Hunan University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Xiaochengqi Decoction* (小承气汤, XCQD) in the treatment of rats with acute severe traumatic brain injury (sTBI) from the perspective of intestinal flora. **Methods** A total of 90 SD rats were randomly divided into normal group, sham operation group, model group, golden bifid group and XCQD group, with 18 rats in each group. The sTBI rat model was made using Freney's free fall method in the model group, golden bifid group and XCQD group. Six hours after successful modeling, 6.17 g/kg of golden bifid and 2.78 g/kg of XCQD was given into the corresponding group by gavage, respectively, while 2.78 ml/(kg·d) of normal saline were administered by gavage in the normal group, sham operation group and model group. After seven days of intervention, the neurological severity score (NSS) was assessed. Pathological changes of brain tissue and colon were observed through hematoxylin eosin (HE) staining, and changes of colon flora were analyzed by 16S rRNA sequencing. The expression of interleukin-1 β (IL-1 β) in brain and colon tissue was detected by Western blotting, and serum IL-1 β level was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** There was no significant difference between the normal and sham operation group in all outcomes ($P>0.05$). Compared with the normal group, the model group had reduced weight and increased NSS ($P<0.01$). HE staining showed that there was brain tissue structure disorder, abundant necrotic neurons, cell swelling and interstitial edema of the scattered living nerve cells, destruction of mucosal integrity, disorder of intestinal gland arrangement, widening of intestinal space and mucosal edema in the model group. Compared with those in the normal group, the expression of IL-1 β in brain and colon tissue and the serum IL-1 β level in the model group significantly increased ($P<0.01$). The Shannon and Simpson diversity indexes in the model group decreased; the relative abundance of Firmicutes and Spirochetes decreased, while the abundance of Bacteroidetes, Proteobacteria, Elusimicrobia, Actinobacteria, and Euryarchaeota increased; the relative abundance of Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, Bacteroidales_S24-7 group and Spirochaetaceae decreased significantly, while the abundance of Bacteroidae, Enterobacteriaceae, Elusimicrobiaceae and Alcaligenaceae increased; the relative abundance of Lachnospiraceae_NK4A136_group, Lachnospiraceae_UCG-005, Romboutsia, Poseburia, Prevotellaceae_NK3B31_group, Prevotellaceae_UCG-001, Alloprevotella and Treponema_2 decreased, and the abundance of Bacteroides, Escherichia-Shigella, Parabacteroides and Elusimicrobium increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with the model group, the XCQD and the golden bifid group had higher weight of the rats and lower NSS ($P<0.05$ or $P<0.01$), as well as decreased pathological changes in the brain and colon tissue, the expression of IL-1 β in brain and colon tissue, and the serum IL-1 β level ($P<0.01$), with more decreases of serum IL-1 β level in the XCQD group ($P<0.05$). Compared with the model group, the Shannon and Observed_species indexes of the intestinal flora in the XCQD group increased ($P<0.01$). The abundance of those changed in model group were reversed in the opposite direction except Euryarchaeota, Bacteroidales_S24-7 group and Prevotella-UCG-001 ($P<0.05$). **Conclusion** XCQD can improve intestinal flora imbalance, promote the growth of beneficial bacteria producing short chain fatty acids, inhibit harmful bacteria producing endotoxin, and reduce the secondary inflammatory response, which may explain its mechanism in treatment of sTBI model rats.

Keywords severe traumatic brain injury; *Xiaochengqi Decoction* (小承气汤); intestinal flora; inflammatory response (收稿日期: 2021-11-26; 修回日期: 2022-02-28)

[编辑: 邓媛]