

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.05.011

腹泻型肠易激综合征常见证型粪便肠道菌群宏基因组学横断面研究

熊钦, 李奕霖, 姚承佼, 罗利红, 谢凤娇, 杨春荣, 董朝强, 冯培民✉

成都中医药大学附属医院, 四川省成都市金牛区十二桥路39号, 610075

[摘要] **目的** 探讨腹泻型肠易激综合征 (IBS-D) 常见证候肠道菌群结构及功能特征。**方法** 招募2020年1月1日至2021年3月31日就诊于成都中医药大学附属医院的IBS-D患者, 及同期成都中医药大学附属医院体检中心招募的健康受试者。IBS-D患者分为肝郁脾虚型IBS-D、脾虚湿盛型IBS-D, 与健康受试者分别组成肝郁脾虚组、脾虚湿盛组及健康组。采集一般资料, 包括年龄、性别、身体质量指数 (BMI), IBS-D患者另采集肠易激综合征症状严重程度量表 (IBS-SSS)、肠易激综合征生活质量评分量表 (IBS-QOL) 评分。同时收集新鲜粪便标本, 采用宏基因组测序技术进行检测, 对注释的肠道菌群结构与功能进行丰度统计展示、PCoA、Anosim、LEfSe生物信息分析。**结果** 三组受试者一般资料差异无统计学意义 ($P>0.05$); 肝郁脾虚组、脾虚湿盛组IBS-SSS、IBS-QOL评分差异无统计学意义 ($P>0.05$)。研究纳入肝郁脾虚组、脾虚湿盛组及健康组各28例。肝郁脾虚组患者特有基因数量为269 135个, 脾虚湿盛组特有基因数量为216 156个, 健康组特有基因数量为249 759个, 三组共有基因数量为1 784 036个。三组间在肠道菌群排名前十物种的相对丰度分布上存在差异, 在门、纲、目层级差异较小, 在科、属、种层级差异较大。三组间肠道菌群结构与功能相对丰度存在差异。种水平的物种PCoA、Anosim分析显示三组间菌群组成有明显差别。进一步LEfSe分析显示, 肝郁脾虚组患者筛选到14种优势菌种, 其中 *Clostridium* sp. CAG 217、*Lachnospira pectinoschiza*、*Anaerotruncus* sp. CAG 528、*Paenibacillus sordellii*、*Eubacterium* sp. CAG 76、*Bacillus cereus* 丰度差异影响程度较大; 脾虚湿盛组筛选到24种优势菌种, 其中 *Roseburia inulinivorans*、*Eubacterium* sp. CAG 251、*Roseburia hominis*、Unclassified *Eubacterium rectale*、*Roseburia intestinalis*、*Megamonas funiformis* 丰度差异影响程度较大; 未筛选到肝郁脾虚组患者的优势功能基因, 脾虚湿盛组筛选到鞭毛装配 (ko02040)、卟啉代谢 (ko00860)、沙门氏菌感染 (ko05132)、苯甲酸降解 (ko00362) 4种优势功能基因。肝郁脾虚组、脾虚湿盛组差异优势功能基因可能主要集中在新陈代谢 (包括外源物质的生物降解和代谢、能量代谢、脂质代谢等) 方面。**结论** 肝郁脾虚型IBS-D患者肠道菌群结构特征表现为包括 *Clostridium* sp. CAG 217在内的14种菌种富集。脾虚湿盛型IBS-D患者肠道菌群结构特征表现为包括 *Roseburia inulinivorans* 在内的24种菌种富集, 功能特征表现为鞭毛装配等4种功能富集。*Clostridium* sp. CAG 217、*Roseburia inulinivorans* 分别有望成为肝郁脾虚、脾虚湿盛型IBS-D患者的生物标志物。

[关键词] 腹泻型肠易激综合征; 肝郁脾虚; 脾虚湿盛; 宏基因组学; 肠道菌群

肠易激综合征 (irritable bowel syndrome, IBS) 是一种以肠道功能 (排便频率或粪便性状) 改变和肠道功能相关腹痛为特征, 对患者生活质量和社会功能有重大影响的常见功能性胃肠疾病^[1-2]。腹泻

型肠易激综合征 (IBS-D) 作为国内外IBS的主要亚型^[3-4], 相较于其他亚型的IBS患者生活质量受到影响的程度更大^[5-6]。IBS-D的发病机制尚不完全清楚, 生命早期的不良事件、心理因素或胃肠道感染等因素, 在遗传易感性的基础上, 可触发控制肠道运动、感觉、黏膜屏障和分泌功能的肠神经系

基金项目: 国家自然科学基金 (81673854)

✉ 通讯作者: fpmvv@126.com

统发生改变从而发病,其中肠道菌群有着重要的作用^[1]。中医学认为脾胃虚弱、肝失疏泄是 IBS-D 的关键病机^[7]。在临床中,肝郁脾虚证、脾虚湿盛证是 IBS-D 最常见的证候类型^[8-9]。IBS-D 不同证型与肠道菌群的相关性很早便引起了人们的关注,前期研究采用粪便培养的方法^[10]、16S rRNA 基因测序技术^[11]、宏基因组学^[12]进行了探索,发现 IBS-D 不同证候部分特征性的肠道菌群改变。然而肠道菌群、IBS-D 中医证候与 IBS-D 发病机制之间的关系仍不明确。宏基因组学技术能真实地反映样品中微生物结构组成、相互作用的情况,同时能分析分子水平代谢通路、基因功能,是研究肠道菌群的有力工具^[13]。本研究采用宏基因测序技术探讨肝郁脾虚及脾虚湿盛型 IBS-D 患者肠道菌群结构及功能特征,以期指导中医辨证从而提升 IBS-D 临床疗效。本研究获得了成都中医药大学附属医院医学伦理委员会批准(批准文号:2019KL-024)。

1 临床资料

1.1 研究对象来源

本研究为横断面研究。IBS-D 患者来自 2020 年 1 月 1 日至 2021 年 3 月 31 日就诊于成都中医药大学附属医院消化内科门诊、内镜中心及住院部的患者;健康受试者来自于同期成都中医药大学附属医院体检中心招募的人员。纳入的肝郁脾虚型 IBS-D 患者、脾虚湿盛型 IBS-D 患者和健康受试者分别组成肝郁脾虚组、脾虚湿盛组及健康组。

1.2 诊断标准

西医诊断标准:IBS-D 参考罗马 IV 诊断标准^[14]。

中医证候诊断标准:肝郁脾虚、脾虚湿盛证参考《肠易激综合征中医诊疗专家共识意见(2017)》^[7]的辨证分型。

1.3 纳入标准

1) 同时满足上述诊断标准;2) 肠易激综合征症状严重程度量表(IBS-SSS)^[15]评分>75 分;3) 年龄 18~65 岁;4) 签署知情同意;5) 具备基本的理解能力和阅读文字能力。

1.4 排除标准

1) 合并心脑血管、呼吸系统、内分泌系统、造血系统等严重内科疾病;2) 精神疾病病史,酒精及药物滥用史;3) 既往胃肠道手术史(剖宫产及阑尾切除术除外);4) 近 1 个月内有影响肠道菌群和胃肠动力药物史,或近 2 周内有其他治疗 IBS 的中西医药物史;5) 妊娠、哺乳期妇女;6) 中医

辨证存在兼夹证;7) 研究者认为不适合入选的因素(如失访、脱落风险高等)。

1.5 健康受试者选择标准

1) 年龄 18~65 岁;2) 无明显腹泻、便秘、便血等消化道症状;3) 近 3 个月内肠镜检查无明显器质性病变;4) 近 3 个月内无影响肠道菌群和胃肠动力药物史;5) 查体、实验室检查、腹部彩超、心电图未见明显异常;6) 签署知情同意。

2 方法

2.1 观察指标及方法

2.1.1 一般资料采集 采集所有受试者一般资料,包括年龄、性别、身体质量指数(BMI)。IBS-D 患者另采集 IBS-SSS^[15]、肠易激综合征生活质量评分量表(IBS-QOL)^[16]评分。

2.1.2 粪便宏基因组学检测及分析 主要试剂及仪器:NEBNext® Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina(英国 NEB 公司,货号:E7370L)、Qubit® ds-DNA Assay Kit in Qubit® 2.0 Fluorometer(美国 Life Technologies 公司批号:Q32866)、粪便 DNA 提取试剂盒(中国 TIANGEN 公司,批号:DP712)、Agilent 2100 型生物分析仪、Diagenode Picoruptor 型超声波破碎仪、Illumina NovaSeq 6000 型测序仪、Qubit® 2.0 型荧光计,北京诺禾致源生物信息科技有限公司。

1) 粪便收集:收集受试者的新鲜粪便标本,采样前要求排空膀胱。使用无菌粪勺在粪便内部至少 3 个部位取材,要求 3~5 g 标本量,避免标本污染。取样完成后,将标本于 30 min 内置于液氮中冻存,4 h 后转运至-80℃冰箱保存,用于粪便宏基因组测序。

2) 粪便宏基因组测序:粪便标本经 DNA 提取、DNA 质检、文库构建及质检、DNA 测序完成粪便宏基因组测序。

3) 生物信息学分析:上述步骤得到的原始数据经质量控制以及宿主过滤,获取有效数据用以后续分析。使用 MEGAHIT 1.0.4 对有效数据进行组装分析,接着将生成的拼接骨架在 N 连接处打断,得到不含 N 的骨架连接序列。采用 Bowtie 2 2.2.4 将各样品组装后的骨架连接序列与质控后的有效数据进行比对,去除<500 bp 的骨架连接序列片段^[17]。对单样品组装后的骨架连接序列使用 MetaGeneMark 2.10 进行 ORF 预测,清除预测结果中<100 nt 的结果^[18];使用 CD-HIT 4.5.8 去冗余;然后利用

Bowtie 2 2.2.4 与有效数据进行比对，计算基因比对上的 reads 数目。删除各样品中 reads 数目≤2 的基因，生成最终的 Unigenes；计算各基因的丰度信息。使用 DIAMOND 0.9.9.110 将 Unigenes 比对至美国国家生物技术信息中心（NCBI）的非冗余数据库、京都基因与基因组百科全书（KEGG）数据库，进行物种、功能注释和丰度统计。根据丰度表进行丰度前十展示、PCoA、Anosim、LEfSe 分析以探索样品间的物种、功能组成及差异。

2.2 质量控制及缺失值处理

研究开始前统一对参与研究人员进行一般资料采集、证型判定、信息录入与核对校验、粪便收集及储存标准培训。粪便宏基因组测序流程、原始数据质量控制均由北京诺禾致源生物信息科技有限公司完成。云平台分析按平台标准流程进行操作。

缺失值采用期望最大算法（连续性变量）和众数（离散型变量）进行插补。

2.3 统计学方法

应用 SPSS 26.0 进行统计分析。计数资料采用频数或百分率表示，组间差异比较采用 χ^2 检验或者 Fisher 确切概率法。计量资料属于正态分布的用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 进行描述，否则用中位数（四分位数）[$M(P_{25}, P_{75})$] 描述。两组间比较选择 t 检验（正态分布且方差齐）、 t' 检验（正态分布但方差不齐）或 Wilcoxon 秩和检验（非正态分布）；三组间比较，数据服从正态分布且方差齐选择 F 检验（之后两两比较采用 LSD 法），否则使用 H 检验（之后两两比较采用 Bonferroni 法进行校正）。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。在诺禾云平台 (<https://magic.novogene.com/customer/main#/loginNew>) 进行生物信息学分析。PCoA 分析：一种通过特征值和特征向量排序实现降维分析的方法。根据 Bray-

Curtis 距离进行计算，并通过主坐标组合进行作图展示。样品距离反映物种/功能组成结构相似性，接近则相似，远离则差异较大。Anosim 分析：一种用来评估组间差异是否大于组内差异、评价分组合理性的非参数检验方法。若 $R > 0$ 提示组间差异大于组内差异， $R < 0$ 提示组间差异小于组内差异， $P < 0.05$ 显示差异具有统计学意义。LEfSe 分析：研究组间差异具有统计学意义的物种/功能的一种方法，是非参数检验和线性判别分析（LDA）的结合，用于生物标志物的筛选。设置 LDA 筛选阈值为 2，LDA 值 > 2 提示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组一般资料比较

研究纳入肝郁脾虚组、脾虚湿盛组及健康组各 28 例。表 1 示，三组受试者的年龄、性别、BMI 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；肝郁脾虚组、脾虚湿盛组比较，IBS-SSS、IBS-QOL 评分差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3.2 各组肠道菌群基因数量分析

肝郁脾虚组患者特有基因数量为 269 135 个，脾虚湿盛组特有基因数量为 216 156 个，健康组特有基因数量为 249 759 个，三组共有基因数量为 1 784 036 个；肝郁脾虚组和脾虚湿盛组患者共有基因数量为 2 029 798 个，肝郁脾虚组和健康组共有基因数量为 1 997 512 个，脾虚湿盛组和健康组共有基因数量为 1 964 193 个。

3.3 基因物种注释

3.3.1 物种相对丰度概况 肝郁脾虚组、脾虚湿盛组、健康组三组间在肠道菌群排名前十的物种的相对丰度分布上存在差异，在门、纲、目层级差异较小（仅展示门水平，详见图 1），在科、属、种层级差异较大（仅展示属水平，详见图 2）。

表 1 各组 IBS-D 患者和健康组受试者一般资料比较

Table 1 Comparison of general information of patients of irritable bowel syndrome with diarrhea in each group and participants in healthy group

项目	肝郁脾虚组(28 例)	脾虚湿盛组(28 例)	健康组(28 例)	统计量 ($F/\chi^2/H/t$)	P 值
年龄/岁, $\bar{x} \pm s$	42.75±11.40	41.14±11.92	41.75±12.12	0.132	0.877
性别(男/女)/例	17/11	17/11	12/16	2.403	0.301
BMI/kg·m ⁻² , $M(P_{25}, P_{75})$	23.23(20.78, 26.41)	24.36(22.81, 25.84)	22.89(20.51, 25.40)	4.014	0.134
IBS-SSS 评分/分, $\bar{x} \pm s$	274.61±43.48	264.64±46.11	—	0.832	0.409
IBS-QOL 评分/分, $\bar{x} \pm s$	559.68±56.34	547.15±65.94	—	0.765	0.448

注：IBS-D，腹泻型肠易激综合征；BMI，身体质量指数；IBS-SSS，肠易激综合征症状严重程度量表；IBS-QOL，肠易激综合征生活质量评分量表。

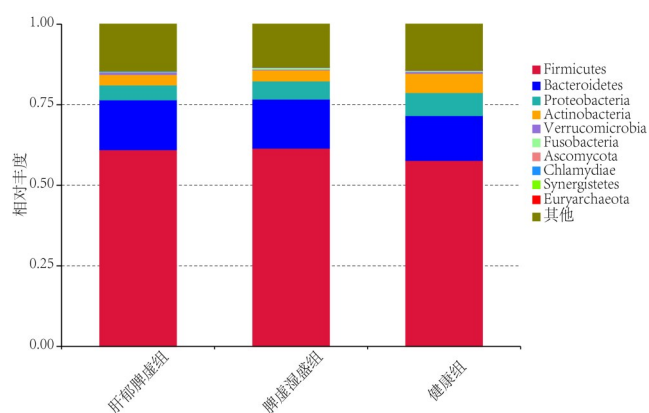


图 1 肠道菌群门水平排名前十物种的相对丰度

Figure 1 Relative abundance of the top ten species ranked at the level of gut microbiota phylum

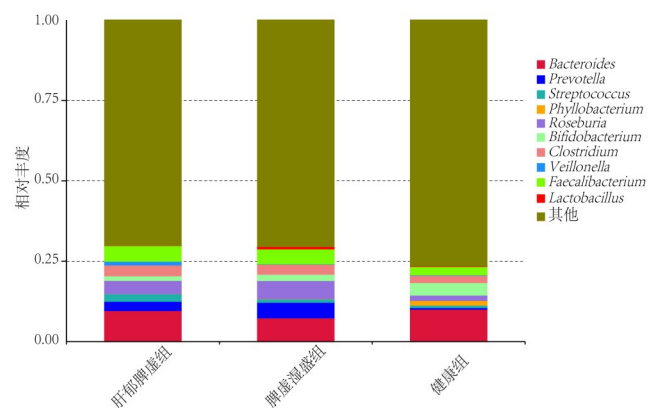


图 2 肠道菌群属水平排名前十物种的相对丰度

Figure 2 Relative abundance of the top ten species at the level of gut microbiota genus

3.3.2 物种PCoA分析 基于各分类层级进行PCoA分析,在种水平,肝郁脾虚组、脾虚湿盛组、健康组三组样本组间拟合的圆圈重合率较低,样本间存在差异(见图3)。

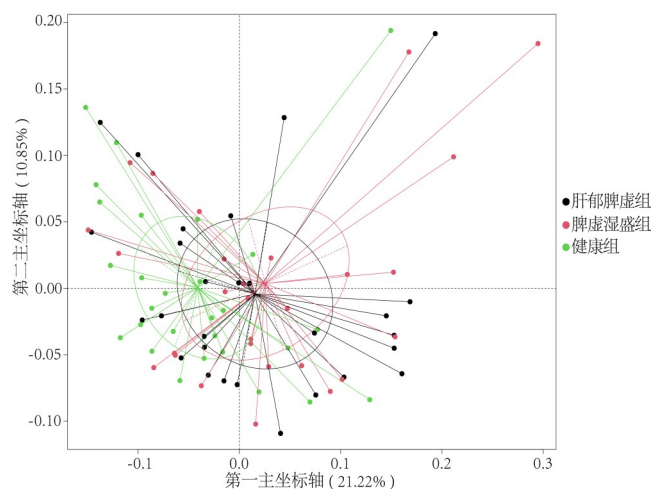


图 3 种水平的物种PCoA分析图

Figure 3 Plot of PCoA analyses of species at the species level

3.3.3 物种Anosim分析 基于各分类层级进行Anosim分析,在种水平, $R=0.0238$,提示肝郁脾虚组、脾虚湿盛组、健康组三组组间差异大于组内差异($P=0.047$),故分组具有合理性(详见图4)。

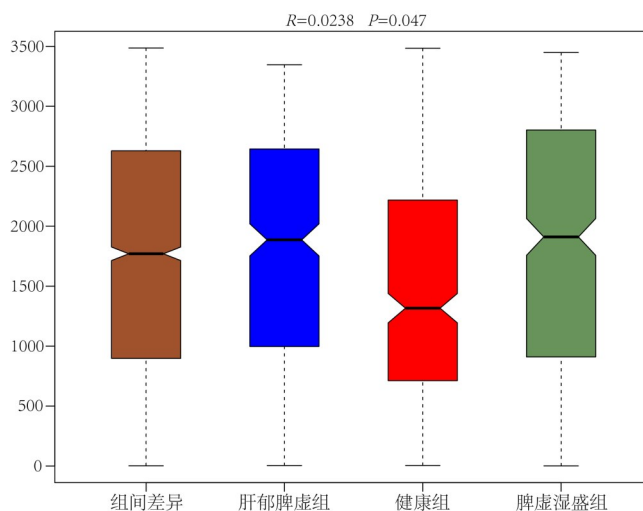


图 4 种水平的物种Anosim分析图

Figure 4 Anosim analyses of species at the species level

3.3.4 物种LEfSe分析 肝郁脾虚组筛选到14种优势菌种,其中*Clostridium* sp. CAG 217、*Lachnospira pectinoschiza*、*Anaerotruncus* sp. CAG 528、索氏梭菌(*Paeniclostridium sordellii*)、*Eubacterium* sp. CAG 76、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)丰度差异影响程度较大。脾虚湿盛组筛选到24种优势菌种,其中*Roseburia inulinivorans*、*Eubacterium* sp. CAG 251、*Roseburia hominis*、Unclassified *Eubacterium rectale*、*Roseburia intestinalis*、单形巨单胞菌(*Megamonas funiformis*)丰度差异影响程度较大。健康组筛选到17种优势菌种,其中*Blautia* sp. KLE 1732、*Ochrobactrum rhizosphaerae*、*Ruminococcus* sp. SR1 5、*Tyzzerella* sp. Marseille P3062、迟缓埃格特菌(*Eggerthella lenta*)、Unclassified *Lachnospiraceae bacterium* 2 1 58FAA丰度差异影响程度较大(详见图5)。

3.4 功能注释

3.4.1 功能相对丰度概况 肝郁脾虚组、脾虚湿盛组、健康组三组在KEGG PATHWAY level 1水平,新陈代谢相对功能丰度最高;在level 2水平,碳水化合物代谢相对功能丰度最高;在level 3水平,功能基因相对丰度排名前十的有ATP结合盒转运蛋白(ko02010)、嘌呤代谢(ko00230)、核糖体(ko03010)等。三组间在肠道菌群KEGG PATHWAY数据库排名前十的功能相对丰度上存在

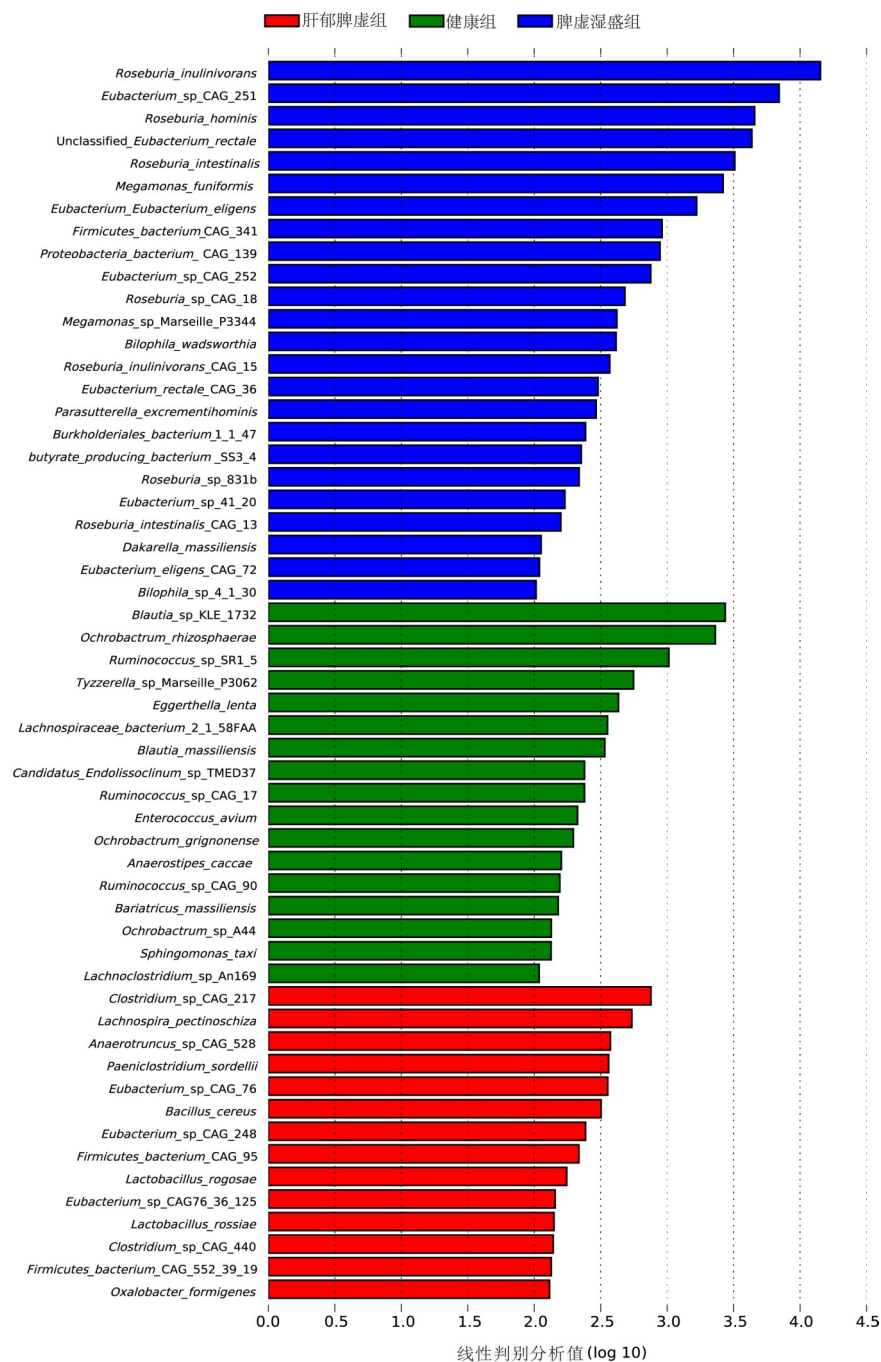


图5 种水平的物种LEfSe分析图
Figure 5 Plot of species LEfSe analyses at the species level

差异（仅展示 level 3 水平，见图 6）。

3.4.2 功能 PCoA 分析 基于各功能层级进行 PCoA 分析，肝郁脾虚组、脾虚湿盛组、健康组三组样本组间拟合的圆圈重合较多，但并非完全重合或包含，故存在一定的差异（仅展示 level 3 水平，详见图 7）。

3.4.3 功能 Anosim 分析 基于各功能层级进行 Anosim 分析， R 均 <0 ， P 均 >0.05 ，提示肝郁脾虚组、脾虚湿盛组、健康组三组间组间差异可能小

于组内差异（仅展示 level 3 水平，详见图 8）。

3.4.4 功能 LEfSe 分析 在 level 3 水平，未筛选到肝郁脾虚组的优势功能基因；在脾虚湿盛组中，优势功能基因有鞭毛装配（ko02040）、卟啉代谢（ko00860）、沙门氏菌感染（ko05132）、苯甲酸降解（ko00362）；在健康组中，优势功能基因有氧化磷酸化（ko00190）、氯烷烃和氯烯烃的降解（ko00625）、脂肪酸降解（ko00071）、萘的降解（ko00626），详见图 9。level 3 水平筛选到的差异功

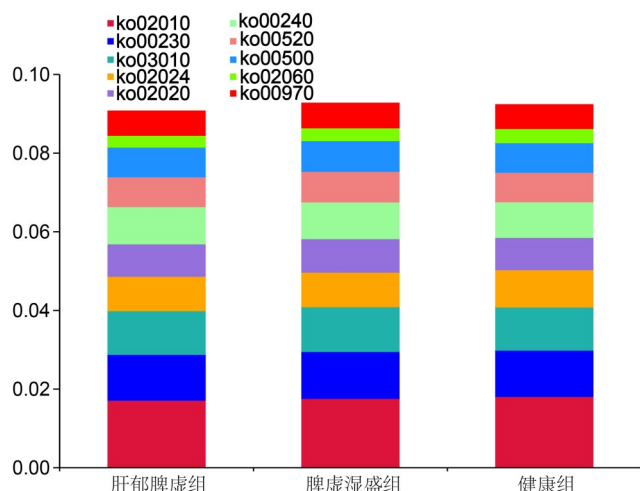


图6 KEGG PATHWAY 数据库 level 3 水平排名前十功能的相对丰度柱状图

Figure 6 Histogram of relative abundance of the top ten functions ranked at level 3 of the KEGG PATHWAY database

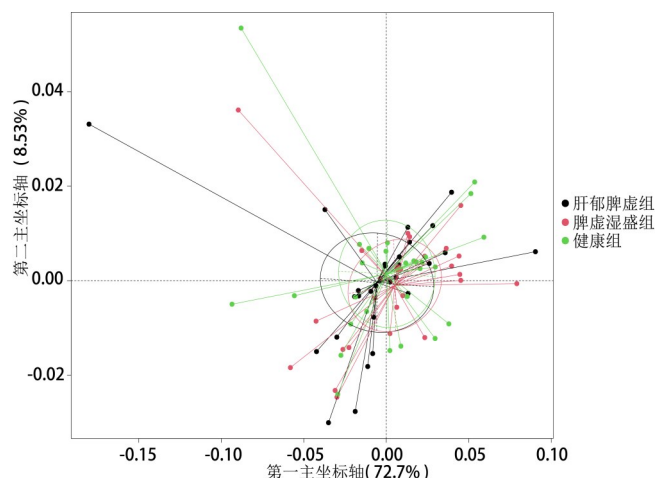


图7 level 3 水平的功能 PCoA 分析图

Figure 7 Functional PCoA analysis plot for level 3

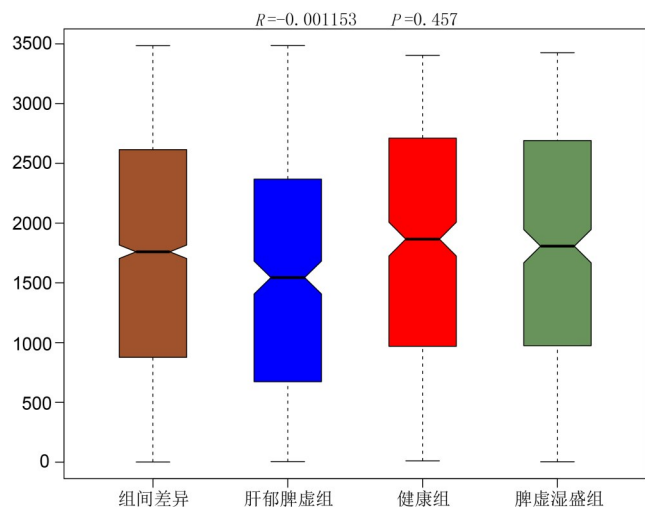


图8 level 3 水平的功能 Anosim 分析图

Figure 8 Functional Anosim analysis plot for level 3

能在 level 1 水平主要集中在新陈代谢 (Metabolism), level 2 水平集中在外源物质的生物降解和代谢 (Xenobiotics biodegradation and metabolism)、能量代谢 (Energy metabolism)、脂质代谢 (Lipid metabolism) 等。

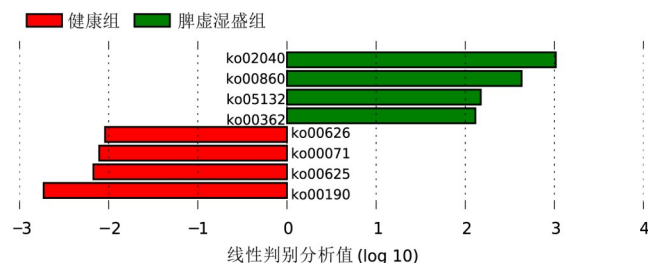


图9 level 3 水平的功能 LEfSe 分析图

Figure 9 Functional LEfSe analysis plot for level 3

4 讨论

“证”是一个整体、宏观的概念，特定疾病的中医证候类型其肠道菌群结构可能存在一定的特征。有研究^[19]通过粪便 16S rRNA 基因测序数据分析发现肠道菌群结构有助于区分脾虚湿蕴型和大肠湿热型溃疡性结肠炎。还有研究^[20]发现了肠道菌群组成可辅助代谢综合征中医证型的鉴别。本研究结果显示，通过比较肝郁脾虚组、脾虚湿盛组及健康组三组粪便宏基因组测序物种注释相对丰度结果发现，三组间肠道菌群结构存在差异。物种 PCoA 分析提示三组间肠道菌群在种水平实现了较易区分的聚类。在种水平的物种 Anosim 分析显示 $R>0$, $P>0.05$ 进一步验证了组间差异大于组内差异，证实种水平的肠道菌群结构有助于判定 IBS-D 证型。以上结果进一步证实了肠道菌群的组成有助于证型鉴别。

肝郁脾虚证基本病机为肝失疏泄，脾失健运，多因情志不遂，郁怒伤肝，肝失条达，横乘脾土；或饮食劳倦，损伤脾气，脾失健运，土壅侮木，肝失疏泄所致。脾虚湿盛证基本病机为脾胃虚弱，湿浊内停所致，多因饮食不节，或劳倦过度，或忧思日久，或素体脾虚等致脾胃虚弱，不能运化津液，水湿内停；或感受外湿，内困中阳，运化不力所致。物种 LEfSe 分析发现肝郁脾虚组患者有 14 种优势菌种，脾虚湿盛组有 24 种优势菌种，差异的优势菌种可能与证候病机形成存在一定关联。Chao^[11]等研究 IBS-D 脾肾阳虚、肝郁脾虚证患者粪便肠道菌群显示，脾肾阳虚证在梭杆菌属 (*Fusobacterium*) 等富集，肝郁脾虚证在链球菌属 (*Streptococcus*) 富集。一项基于粪便宏基因组测序

的 LEfSe 分析, 未见湿热型 IBS-D 患者显著性富集的菌群^[12]。与既往 IBS-D 中医证候肠道菌群研究^[11-12]相比, 因证型选择、肠道菌群检测方法等差异, 本研究并未发现相同的菌种改变。

本研究筛选到 IBS-D 证型具有显著差异的菌种。根据肝郁脾虚组物种 LEfSe 分析结果, *Clostridium* sp. CAG 217 在 14 种优势菌种中影响最大, 其有望成为肝郁脾虚型 IBS-D 生物标志物。*Clostridium* sp. CAG 217 目前作用尚不完全明确, 一项研究发现其在重度抑郁症患者中丰度降低, 表明该菌种可能与抑郁相关^[21]。肝郁脾虚型 IBS-D 患者一般有较高的抑郁评分^[22], 提示 *Clostridium* sp. CAG 217 可能从抑郁途径参与到肝郁脾虚证的形成。根据脾虚湿盛组物种 LEfSe 分析结果, *Roseburia inulinivorans* 在 24 种优势菌种中影响最大, 其可能是脾虚湿盛型 IBS-D 重要的生物标志物。一般而言, IBS-D 脾虚湿盛证相较于其他证型临床症状较轻^[22]。*Roseburia inulinivorans* 是人体肠道中产生短链脂肪酸 (short-chain fatty acids, SCFAs) 中丁酸和丙酸的主要菌种之一^[23]。SCFAs 可调节肠上皮细胞免疫和炎症, 维持肠黏膜屏障完整性, 改变肠道动力, 并作为“微生物-肠-脑”轴的一部分, 参与 IBS 发病^[24]。包括 *Roseburia inulinivorans* 在内的多种产丁酸细菌在脾虚湿盛型 IBS-D 患者中富集, 生成 SCFAs 可发挥肠道保护作用, 在实现较轻临床表现的同时可能参与脾虚湿盛证的形成。与此同时, 物种 LEfSe 分析筛选到健康组有 17 种优势菌种。故肝郁脾虚型 IBS-D、脾虚湿盛型 IBS-D 在 *Blautia* sp. KLE 1732 等 17 种菌种减少, 提示两种证型存在一些共有的菌群特征表现。

肠道菌群结构与肠道菌群功能密切相关, 但并非完全对应。功能 PCoA 分析显示肝郁脾虚组、脾虚湿盛组、健康组三组间有较多重合, 各功能层级 Anosim 分析显示 $R < 0$ 、 $P > 0.05$ 即组间差异可能小于组内差异。以上结果提示肠道菌群功能丰度组成可能并不能实现对 IBS-D 证型的判别。肝郁脾虚型 IBS-D、脾虚湿盛型 IBS-D 患者肠道菌群有较多重合的代谢功能通路, 可能是两种证型共同的中医病机 (脾虚) 所致。本研究功能 LEfSe 分析未筛选到肝郁脾虚组的优势功能基因, 脾虚湿盛组的优势功能基因有鞭毛装配等, 优势功能基因对应的代谢通路可能参与证候的形成。有研究^[12]发现湿热型 IBS-D 特征性代谢通路包括叶酸一碳库等, 本研究并未发现与该研究类似的菌群代谢功能改变。根据

本研究功能 LEfSe 分析筛选的脾虚湿盛组优势功能基因结果, 鞭毛装配、卟啉代谢可能是脾虚湿盛型 IBS-D 患者肠道菌群较为特异的代谢通路。由于功能 Anosim 分析显示 $R < 0$ 、 $P > 0.05$ 即组间差异可能小于组内差异, 提示差异的代谢通路可能是组内个体间差异的表现, 故本研究发现的肠道菌群差异代谢通路需要进一步验证。

综上, 本研究采用宏基因组测序技术对肝郁脾虚、脾虚湿盛型 IBS-D 患者肠道菌群结构与功能进行描述, 发现肠道菌群结构可辅助 IBS-D 中医辨证, 同时筛选到一些特异性菌种和差异功能, 有助于证候诊断标志物的发现和生物学内涵的探索。

本研究尚存在一定的局限性, 由于研究设计的限制无法对证候与肠道菌群的因果关系、动态演变规律进行推断, 而且因为样本量较少、证型纳入不全面、缺乏验证等, 研究结果的解读受到限制。未来需要更多中医证候的大样本、多中心、纵向队列研究进一步确认肠道菌群结构与功能对证候形成的生物学意义。

参考文献

- [1] FORD AC, SPERBER AD, CORSETTI M, et al. Irritable bowel syndrome [J]. Lancet, 2020, 396 (10263): 1675-1688.
- [2] CAMILLERI M. Diagnosis and treatment of irritable bowel syndrome: a review [J]. JAMA, 2021, 325(9):865-877.
- [3] SPERBER AD, BANGDIWALA SI, DROSSMAN DA, et al. Worldwide prevalence and burden of functional gastrointestinal disorders, results of rome foundation global study [J]. Gastroenterology, 2021, 160(1):99-114.
- [4] LIU YL, LIU JS. Irritable bowel syndrome in China: a review on the epidemiology, diagnosis, and management [J]. Chin Med J (Engl), 2021, 134(12):1396-1401.
- [5] SINGH P, STALLER K, BARSHOP K, et al. Patients with irritable bowel syndrome-diarrhea have lower disease-specific quality of life than irritable bowel syndrome-constipation [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(26): 8103-8109.
- [6] BUONO JL, CARSON RT, FLORES NM. Health-related quality of life, work productivity, and indirect costs among patients with irritable bowel syndrome with diarrhea [J]. Health Qual Life Outcomes, 2017, 15(1):35.
- [7] 张声生, 魏玮, 杨俭勤. 肠易激综合征中医诊疗专家共识意见(2017) [J]. 中医杂志, 2017, 58(18):1614-1620.
- [8] 汪红兵, 张声生, 李振华, 等. 360 例腹泻型肠易激综合征主要证候分布与不同因素关系的研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(3):18-20.

- [9]张艳霞, 赵蓉, 吕双然, 等. 腹泻型肠易激综合征中医证候分布与 VIP、SP、5-HT 动态变化的相关性分析[J]. 河北中医药学报, 2022, 37(1):17-20.
- [10]江月斐, 劳绍贤, 邝枣园, 等. 腹泻型肠易激综合征脾胃湿热证肠道菌群的变化[J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(3):218-220.
- [11]CHAO G, ZHANG S. The characteristics of intestinal flora of IBS-D with different syndromes [J]. Immun Inflamm Dis, 2020, 8(4):615-628.
- [12]李间清. 葛根芩连加味方对湿热证 IBS-D 的临床疗效及对肠道菌群影响的研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2021.
- [13]TRINGE SG, RUBIN EM. Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples [J]. Nat Rev Genet, 2005, 6(11):805-814.
- [14]MEARIN F, LACY BE, CHANG L, et al. Bowel disorders [J]. Gastroenterology, 2016: S0016-5085 (16) 00222-5. doi: 10.1053/j.gastro.2016.02.031.
- [15]FRANCIS CY, MORRIS J, WHORWELL PJ. The irritable bowel severity scoring system: a simple method of monitoring irritable bowel syndrome and its progress [J]. Aliment Pharmacol Ther, 1997, 11(2):395-402.
- [16]PATRICK DL, DROSSMAN DA, FREDERICK IO, et al. Quality of life in persons with irritable bowel syndrome: development and validation of a new measure [J]. Dig Dis Sci, 1998, 43(2):400-411.
- [17]FENG Q, LIANG S, JIA H, et al. Gut microbiome development along the colorectal adenoma-carcinoma sequence [J]. Nat Commun, 2015, 6:6528. doi: 10.1038/ncomms7528.
- [18]ZELLER G, TAP J, VOIGT AY, et al. Potential of fecal microbiota for early-stage detection of colorectal cancer [J]. Mol Syst Biol, 2014, 10(11):766.
- [19]ZHANG YL, CAI LT, QI JY, et al. Gut microbiota contributes to the distinction between two traditional Chinese medicine syndromes of ulcerative colitis [J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(25):3242-3255.
- [20]SHANG H, ZHANG L, XIAO T, et al. Study on the differences of gut microbiota composition between phlegm-dampness syndrome and qi-yin deficiency syndrome in patients with metabolic syndrome [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2022, 13:1063579. doi: 10.3389/fendo.2022.1063579.
- [21]YANG J, ZHENG P, LI Y, et al. Landscapes of bacterial and metabolic signatures and their interaction in major depressive disorders [J]. Sci Adv, 2020, 6(49):eaba8555.
- [22]俞帆. 腹泻型肠易激综合征常见证候与焦虑抑郁关系的探索研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2021.
- [23]HU S, PNG E, GOWANS M, et al. Ectopic gut colonization: a metagenomic study of the oral and gut microbiome in Crohn's disease [J]. Gut Pathog, 2021, 13(1):13.
- [24]JIANG W, WU J, ZHU S, et al. The role of short chain fatty acids in irritable bowel syndrome [J]. J Neurogastroenterol Motil, 2022, 28(4):540-548.

Metagenomics of Fecal Gut Microbiota in Common Traditional Chinese Medicine Syndrome Types of Irritable Bowel Syndrome with Diarrhea: A Cross-sectional Study

XIONG Qin, LI Yilin, YAO Chengjiao, LUO Lihong, XIE Fengjiao, YANG Chunrong, DONG Chaoqiang, FENG Peimin

Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, 610075

ABSTRACT Objective To investigate the structural and functional characteristics of gut microbiota in common traditional Chinese medicine (TCM) syndromes of irritable bowel syndrome with diarrhea (IBS-D). **Methods** IBS-D patients who visited the Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, and healthy participants from the Physical Examination Centre of the same hospital were recruited from 1st January 2020 to 31st March 2021. The IBS-D patients were classified into syndrome of liver constraint and spleen deficiency, and syndrome of spleen deficiency and dampness exuberance; together with the recruited healthy participants, there were liver-constraint group, dampness-exuberance group, and healthy group. General information, including age, gender and body mass index (BMI), were collected, and Irritable Bowel Syndrome Symptom Severity Scale (IBS-SSS) as well as Irritable Bowel Syndrome Quality of Life Scale (IBS-QOL) scores were additionally collected from IBS-D patients. Fresh fecal samples were also collected and tested by macro-genome sequencing technology for abundance statistical display, PCoA, Anosim, LEfSe bioinformatic analysis of the annotated gut microbiota structure and function. **Results** There was no statistically significant difference in the general information of the participants in the three groups ($P>0.05$); the difference in the IBS-SSS and IBS-QOL scores between liver-constraint group and dampness-exuberance group were not statistically significant ($P>0.05$). The study included 28 cases each in liver-constraint group, dampness-exuberance group, and healthy group. The number of specific genes to patients in liver-constraint group was 269 135, with 216 156 in dampness-exuberance group and 249 759 in healthy group, accounting of total 1 784 036 in the three groups. There were differences in the relative abundance distribution of the top ten species of gut microbiota among the three groups, with smaller differences at the phylum, class and order levels, and larger differences at the family, genus and species levels. There were differences in the relative abundance of structure and function of the gut

microbiota among the three groups. Species PCoA and Anosim analyses at the species level showed significant differences in the composition of the microbiota among the three groups. Further LEfSe analyses showed that patients in liver-constraint group were screened for 14 dominant strains, of which *Clostridium* sp. CAG 217, *Lachnospira pectinoschiza*, *Anaerotruncus* sp. CAG 528, *Paeniclostridium sordellii*, *Eubacterium* sp. CAG 76, *Bacillus cereus* were affected to a greater extent in abundance differences; dampness-exuberance group screened 24 species of dominant bacteria, of which *Roseburia inulinivorans*, *Eubacterium* sp. CAG 251, *Roseburia hominis*, Unclassified *Eubacterium rectale*, *Roseburia intestinalis*, and *Megamonas funiformis* were affected to a greater extent in abundance differences; no dominant functional genes were screened for patients in liver-constraint group, and dampness-exuberance group was screened for flagellum assembly (ko02040), porphyrin metabolism (ko00860), salmonella infection (ko05132), and benzoic acid degradation (ko00362). The differentially dominant functional genes in liver-constraint group and dampness-exuberance group may mainly focus on metabolism (including biodegradation and metabolism of exogenous substances, energy metabolism, lipid metabolism, etc.). **Conclusion** IBS-D with syndrome of liver constraint and spleen deficiency is characterized by the enrichment of 14 gut microbiota, such as *Clostridium* sp. CAG 217, while IBS-D with syndrome of spleen deficiency and dampness exuberance is characterized by the enrichment of 24 gut microbiota, such as *Roseburia inulinivorans*, and 4 functional enrichments, such as flagellum assembly. *Clostridium* sp. CAG 217 and *Roseburia inulinivorans* are expected to be biomarkers for IBS-D patients in the two syndromes, respectively.

Keywords irritable bowel syndrome with diarrhea; liver constraint and spleen deficiency; spleen deficiency and dampness exuberance; Metagenome; gut microbiota

(收稿日期: 2023-04-09; 修回日期: 2023-12-13)

[编辑: 王利芬]

(上接第 494 页)

Yiqi Huoxue Formula (益气活血方) for Intrauterine Adhesion with Syndrome of Qi Deficiency and Blood Stasis: A Randomized Controlled Trial

QIN Yuling, SUI Juan, ZHOU Lin, BI Hong, CHEN Ruixue

Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, 100053

ABSTRACT Objective To observe the effectiveness and safety of *Yiqi Huoxue Formula* (益气活血方) combined with surgery and sequential therapy of estrogen and progesterone for the treatment of intrauterine adhesion (IUA) with syndrome of *qi* deficiency and blood stasis. **Methods** Sixty-four patients with IUA were recruited in Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences during 1st June 2021 to 31st December 2022, and they were randomly divided into two groups, with 32 patients in each group, all receiving transcervical resection of adhesions (TCRA). The control group was treated with sequential therapy of estrogen and progesterone after surgery, taking 1 tablet orally daily, estradiol tablets for the first 14 days, and estradiol dydrogesterone tablets for the last 14 days. In the treatment group, the postoperative treatment was combined with *Yiqi Huoxue Formula* on the basis of the treatment in the control group, and 1 dose was taken daily. The treatment course of both groups was 3 months. We observed the clinical effectiveness, syndrome scores of traditional Chinese Medicine (TCM), endometrial thickness, uterine adhesion score, menstrual flow points, and the re-adhesion rate and pregnancy rate 3 months after the end of treatment of the two groups, and conducted evaluation on safety. **Results** The total clinical effective rates of the treatment group and the control group were 90.63% and 75.00%, respectively, significantly better in the treatment group ($P < 0.05$). The endometrial thickness and menstrual flow of patients in both groups increased after treatment, and the scores of uterine adhesion and TCM syndrome scores decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). After treatment, the uterine adhesion score and TCM syndrome scores of the treatment group decreased significantly compared with the control group ($P < 0.05$). The 6-month postoperative pregnancy rate in the treatment group was 37.50%, higher than the 12.50% in the control group ($P < 0.05$). The re-adhesion rate was 3.13% in the treatment group and 9.38% in the control group, and the difference between groups was not statistically significant ($P > 0.05$). No adverse events occurred in both groups. **Conclusion** *Yiqi Huoxue Formula* combined with surgery and sequential therapy of estrogen and progesterone for treating IUA patients with syndrome of *qi* deficiency and blood stasis can promote endometrial recovery, increase menstrual flow, improve patients' clinical symptoms, and improve pregnancy rate, showing certain clinical effectiveness and safety.

Keywords intrauterine adhesion; transcervical resection of adhesions; *Yiqi Huoxue Formula* (益气活血方); estrogen; progesterone; pregnancy rate; endometrium

(收稿日期: 2023-09-13; 修回日期: 2023-12-25)

[编辑: 叶晨]