

## 研究报告

## 七味白术散对菌群失调腹泻小鼠肠道细菌多样性的影响

郭抗萧<sup>1,2</sup> 彭买姣<sup>1</sup> 彭昕欣<sup>1</sup> 惠华英<sup>1\*</sup> 谭周进<sup>1\*</sup>

(1. 湖南中医药大学 湖南 长沙 410208)

(2. 长沙卫生职业学院 湖南 长沙 410100)

**摘要:**【背景】肠道微生物与人体多项生理功能密切相关,我们课题组前期研究表明七味白术散对菌群失调腹泻有较好的疗效。【目的】探讨与七味白术散疗效相关肠道微生物,比较传统中药饮片与超微中药饮片的疗效,进一步明确七味白术散治疗菌群失调腹泻的机理,为临床应用提供科学依据。【方法】应用抗生素建立菌群失调小鼠腹泻模型,分别灌胃给药七味白术散传统汤剂和超微50%量七味白术散汤剂。治疗结束后,提取肠道内容物微生物宏基因组DNA,建立16S rRNA基因文库进行测序。【结果】肠道微生物中的群落由乳酸菌(*Lactobacillus* spp.)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、梭状芽孢杆菌(*Clostridium* spp.)、黏液真杆菌(*Blautia producta*)、毛螺旋菌(*Anaerostipes* spp.)、腐生性葡萄球菌(*Staphylococcus saprophyticus*)和不能培养的细菌组成,其中乳酸菌为优势菌,占全部细菌DNA克隆数的61.90%。经抗生素造模后*Lactobacillus* spp.数量明显减少,*Enterococcus faecium*成为优势菌种,*Clostridium* spp.、*Blautia producta*、*Anaerostipes* spp.和*Staphylococcus saprophyticus*等在数量上开始有增长的趋势,而治疗结束后,传统七味白术散治疗组和超微50%量七味白术散治疗组的*Lactobacillus* spp.比例均有所恢复,且超微50%量七味白术散治疗组的乳酸菌比例与正常组最接近;通过建立聚类树和计算各组中各菌群的多样性(*H*)、丰富度(*S*)、均匀度(*E*)及优势度指数(*D*)可知,超微50%量七味白术散治疗组可与正常组聚为一类,且超微50%量七味白术散治疗组各项指数与正常组最为接近,说明超微50%量七味白术散治疗组肠道微生物的基因文库及多样性与正常组最接近,超微50%量七味白术散汤剂的治疗效果优于七味白术散传统汤剂。【结论】应用16S rRNA基因克隆文库技术进一步明确了正常小鼠肠道中细菌群落的组成,以及七味白术散对菌群失调腹泻小鼠肠道细菌群落的恢复效果,超微50%量七味白术散汤剂的治疗效果优于七味白术散传统汤剂。

**关键词:** 肠道微生物, 基因文库, 多样性, 16S rRNA 基因, 七味白术散

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (81573951, 81703985); Prescription Hunan Province Key Discipline

\*Corresponding authors: E-mail: HUI Hua-Ying: huihuaying2003@126.com; TAN Zhou-Jin: tanzhjin@sohu.com

Received: September 21, 2017; Accepted: January 16, 2018; Published online (www.cnki.net): May 15, 2018

基金项目: 国家自然科学基金(81573951, 81703985); 方剂学湖南省重点学科

\*通信作者: E-mail: 惠华英: huihuaying2003@126.com; 谭周进: tanzhjin@sohu.com

收稿日期: 2017-09-21; 接受日期: 2018-01-16; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-05-15

## Effects of Qiweibaizhu powder on the intestinal bacterial diversity in dysbacteriotoxic diarrhea mice

GUO Kang-Xiao<sup>1,2</sup> PENG Mai-Jiao<sup>1</sup> PENG Xin-Xin<sup>1</sup> HUI Hua-Ying<sup>1\*</sup>  
TAN Zhou-Jin<sup>1\*</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

(2. Changsha Health Vocational College, Changsha, Hunan 410100, China)

**Abstract:** [Background] Intestinal microbiota is related to several physiological functions of human body. A large number of studies have shown that Qiweibaizhu powder has effects on diarrhea mice. [Objective] Compare with traditional Chinese medicine and ultra-shattered medicine curative effect. To explore the correlation efficacy with Qiweibaizhu powder to provide scientific evidence for the clinical application. [Methods] Dysbacteriotoxic diarrheal mice model were constructed via administration of antibiotics and then treated with traditional Qiweibaizhu powder and 50% amount of ultra-shattered Qiweibaizhu powder. After the treatment, 16S rRNA gene of microorganisms in intestinal contents of different groups was analyzed by PCR cloning, and corresponding gene library was constructed. [Results] *Lactobacillus* spp., *Enterococcus faecium*, *Clostridium* spp., *Blautia producta*, *Anaerostipes* spp., *Staphylococcus saprophyticus* and uncultured bacterium were in the normal intestinal microbial flora, and *Lactobacillus* spp. was the dominant bacteria in the predominant intestinal microbial flora, accounting for 61.90% of the total bacterial DNA clone number. Compared with the control group, the proportion of *Lactobacillus* spp. in the model group was significantly decreased and opportunistic pathogen was increased. After intragastric administration, the proportion of *Lactobacillus* spp. in the traditional Qiweibaizhu powder treatment group and 50% amount of ultra-shattered Qiweibaizhu powder treatment group was recovered, which the proportion of *Lactobacillus* spp. in 50% amount of ultra-shattered Qiweibaizhu powder treatment group was close to the normal group. Through establishing a clustering tree and calculating the diversity (*H*), species richness (*S*) and dominance index (*D*) of each category, we knew that each index of 50% amount of ultra-shattered Qiweibaizhu powder treatment group were approximately to the control group. In conclusion, the intestine microbial diversity of 50% amount of ultra-shattered Qiweibaizhu powder treatment group was most close to the normal group. [Conclusion] The 16S rRNA gene clone library technique was used to further clarify the composition of bacterial community in normal mice and the recovery of intestinal bacterial community in Qiweibaizhu powder, and the effect of 50% amount of ultra-shattered Qiweibaizhu powder treatment was better than the traditional Qiweibaizhu powder treatment.

**Keywords:** Intestinal microbiota, Gene library, Diversity, 16S rRNA gene, Qiweibaizhu powder

人体肠道内有大量的微生物, 它们的构成和活  
动影响着宿主的免疫、粘膜发育和营养与药物代  
谢<sup>[1-4]</sup>。肠道菌群的组成和功能与宿主的健康状态密  
不可分<sup>[5-6]</sup>。研究表明腹泻和肠道菌群失调密切相  
关, 正常肠道菌群可通过产生细菌素、短链脂肪酸  
等物质来降低氧化还原反应、降解病原体毒素, 并  
可杀死外袭菌或降低其毒性。常驻菌栖居在肠道粘  
膜的表面, 阻碍了病原体与肠粘膜的接触, 形成防  
止外袭菌在宿主体内定殖的屏障, 从而具有了防御

感染的能。正常菌群可刺激宿主产生免疫及清除  
机制, 如加强抗体产生、刺激吞噬细胞功能和增加  
干扰素产生等。因此, 肠道菌群数量改变和比例失  
调可使致病菌产生作用而导致腹泻, 而慢性腹泻又  
可加重菌群失调。腹泻患者盲目应用抗生素不仅消  
灭了敏感的具有屏障作用能拮抗外袭菌的有益细  
菌导致菌群失调加重, 而且抗生素可引起真菌感  
染, 加重腹泻, 导致恶性循环<sup>[7-10]</sup>。本课题组前期  
研究表明<sup>[11]</sup>七味白术散对菌群失调腹泻有较好疗

效,而且七味白术散传统汤药与超微 50%量七味白术散汤药、超微 25%量七味白术散+25%量酵母菌微生态制剂对菌群失调腹泻有较好的疗效且疗效相当。

肠道微生物结构复杂,大多数菌种无法在实验室培养,传统的培养方法不可避免地造成了菌群的富集和衰减,而且传统微生物培养方法操作费时费力,受外界因素影响较大,研究肠道菌群的种类也不够全面,无法从基因进化的角度对肠道菌群进行分类研究<sup>[1]</sup>。采用 16S rRNA 基因克隆文库技术既可以分析样品中肠道微生物的种类,又可以反映各种微生物在肠道中的相对比例,而且通过这种方式可以检测实验室条件下不能培养的微生物<sup>[12-13]</sup>。本实验采用 16S rRNA 基因克隆文库技术分析菌群失调腹泻小鼠肠道中微生物的多样性和群落结构组成情况,以期为针对性地探明七味白术散对肠道菌群失调腹泻的治疗机理研究提供充足的数据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 动物和饲料

SPF 级 KM 小鼠 24 只,雌雄各半,体质量为 20±2 g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,由湖南中医药大学动物实验中心提供。饲料由湖南中医药大学动物实验中心提供。

#### 1.1.2 药 物

七味白术散复方按文献<sup>[14]</sup>熬制成七味白术散传统汤剂,4 °C 保存备用。将单味中药超微粉碎后,按复方中的配比加入适量开水,搅拌,冷却至 40 °C 后 200×g 低速离心 10 min,取上清液,制成超微饮片 50%量汤剂,4 °C 保存备用<sup>[15]</sup>。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器及培养基

硫酸庆大霉素,宜昌人福药业;头孢拉定,石药集团欧意药业有限公司。将 3 粒头孢拉定胶囊和 6 支硫酸庆大霉素注射液用无菌生理盐水配成浓度为 62.5 g/L 的抗生素混合液,4 °C 保存备用<sup>[15]</sup>。蛋白酶 K、溶菌酶,天津恒兴化学试剂制造有限公司;Taq DNA 聚合酶、DL3000 DNA marker、PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞、

氨苄青霉素、GV pXT19-T 载体,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。PCR 仪, Eppendorf 公司;凝胶成像系统, Bio-Rad 公司。LB 培养基参照文献<sup>[15]</sup>配制。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 动物分组

实验动物适应性喂养后按随机数字表法分成正常组、模型组、传统七味白术散治疗组、超微 50%量七味白术散治疗组,每组 6 只,雌雄各半,分笼饲养。

#### 1.2.2 造模方法

参照文献<sup>[16]</sup>进行造模,粪便变得稀湿即造模成功。

#### 1.2.3 给药方法及剂量

造模成功后灌胃给药,每天 2 次,连续 4 d。正常组及模型组均给予等量的无菌生理盐水,其余各组按临床等效用药剂量给药<sup>[16]</sup>。

#### 1.2.4 小鼠肠道内容物的提取

将处死的小鼠立即放于超净工作台上,无菌采集各组回肠段内容物,收集同组小鼠肠道内容物通过无菌操作进行混匀后,-20 °C 保存备用<sup>[16]</sup>。

#### 1.2.5 样品预处理

取 2.0 g 小鼠肠道内容物于 50 mL 无菌离心管中,加入 30 mL 0.1 mol/L PBS 溶液和 5-10 颗 0.3 mm 的无菌玻璃珠,涡旋混匀,200×g 离心 2 min 后取上清,重复洗涤 2 次;合并上清液,10 000×g 离心 8 min,弃上清;沉淀依次用 PBS 洗涤 1 次、丙酮洗涤 2 次、PBS 洗涤 3 次后重悬于 4 mL TE 缓冲液中(pH 8.0),备用<sup>[17]</sup>。

#### 1.2.6 肠道菌群宏基因组 DNA 的提取

取 500  $\mu$ L 预处理后的菌悬液于 1.5 mL 无菌离心管中,加入 45  $\mu$ L TE 缓冲液、5  $\mu$ L 蛋白酶 K 和 20  $\mu$ L 溶菌酶,37 °C 反应 30 min 后加入 30  $\mu$ L 10% SDS,混匀,37 °C 反应 40 min,每 10 min 振荡一次。加入 100  $\mu$ L 5 mol/L NaCl,混匀;加入 80  $\mu$ L CTAB/NaCl,混匀,65 °C 反应 10 min。按上述方法经酚:氯仿:异戊醇(25:24:1,体积比)抽提等步骤提取基因组 DNA<sup>[17-19]</sup>。

### 1.2.7 细菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGG CTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGAC TT-3') PCR 扩增 16S rRNA 基因, 引物委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

PCR 反应体系: 10×*Taq* buffer 5 μL, dNTP mixture (2.5 mmol/L) 4 μL, 27F 和 1492R (10 μmol/L) 各 1 μL, *Taq* 酶(2.5 U/μL) 1 μL, 模板 DNA 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足至 50 μL。

PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 52 °C 45s, 72 °C 90 s, 36 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 保存于 4 °C 待用。

### 1.2.8 目标片段的回收

采用 PCR 产物纯化试剂盒回收目的片段。

### 1.2.9 肠道细菌 16S rRNA 基因文库的构建及序列测定

将纯化回收后的 DNA 片段连接至 GV pXT19-T 载体上, 转化进入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 在含有 IPTG 和 X-Gal 及氨苄青霉素(100 mg/L)的 LB 平板上 37 °C 培养过夜。将转化后平板置于 4 °C 培养 4 h, 使蓝白色菌落充分显现。从 LB 培养基上用无菌牙签挑取白色菌落, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测序使用 M13 Primer。

## 1.3 统计分析

### 1.3.1 多样性指数

选用 Shannon-Wiener 指数(*H*)、丰富度指数(*S*)分析肠道中微生物多样性特征, 采用 Simpson 优势度指数(*D*)测定群落内不同物种所占的地位。

### 1.3.2 聚类树的构建

采用 SPSS 20.0 软件处理数据, 构建聚类树。

## 2 结果与分析

### 2.1 连接与转化

通过蓝白斑筛选计算 DNA 转化率, DNA 转化率是指每微克载体 DNA 在最佳转化条件下进入受体细胞的分子数, 是衡量转化效率的重要指标, 经计算所得 DNA 转化率为  $1.1 \times 10^7$  个/μg, 可见感受

态细胞正常且转化效率较高<sup>[20]</sup>。进一步的实验结果表明, 当外源片段与载体以 9:1 的比例连接时, 所得转化子最多, 正常组、模型组、传统七味白术散治疗组和超微 50% 量七味白术散治疗组的克隆子分别约为  $2.0 \times 10^3$ 、 $2.2 \times 10^3$ 、 $1.9 \times 10^3$  和  $2.0 \times 10^3$  个, 白斑比率达 90% 以上, 通过计算得知各组别所得克隆子均高于 1 150, 已达到建库的容量<sup>[21]</sup>。

### 2.2 肠道微生物 16S rRNA 基因克隆文库的建立

各组随机挑取 1 300 个阳性菌落送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 引物为 M13。结果如表 1 所示, 经 DNA 序列分析和同源性比较可知, 肠道细菌的构成表现出明显的多样性, 有约式乳酸菌(*Lactobacillus* spp.)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、梭状芽孢杆菌(*Clostridium* spp.)、黏液真杆菌(*Blautia producta*)、毛螺旋菌(*Anaerostipes* spp.)、腐生性葡萄球菌(*Staphylococcus saprophyticus*)和不能培养的细菌(Uncultured bacterium)等 7 个分属, 同属间相似性达到 97% 以上; 正常组以 *Lactobacillus* spp. 为优势菌种; 经过抗生素造模后 *Lactobacillus* spp. 数量明显减少, *Enterococcus faecium*、*Clostridium* spp.、*Blautia producta*、*Anaerostipes* spp. 和 *Staphylococcus saprophyticus* 等在数量上有所增加, *Enterococcus*

表 1 各组肠道中存在的菌种类别及数目

Table 1 Species and number of strains in the intestinal tract

Species	1	2	3	4
<i>Lactobacillus</i> spp.	804	300	595	720
<i>Enterococcus faecium</i>	248	420	195	360
<i>Clostridium</i> spp.	114	300	192	142
<i>Blautia producta</i>	3	60	8	3
<i>Anaerostipes</i> spp.	5	60	12	5
Uncultured bacterium	124	120	260	60
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2	40	30	10

注: 1: 正常组; 2: 模型组; 3: 传统七味白术散治疗组; 4: 超微 50% 量七味白术散治疗组。

Note: 1: The normal group; 2: The model group; 3: The group treated with traditional Qiweibaizhu powder; 4: The group treated with 50% the amount of ultra-shattered Qiweibaizhu powder.

*feacium* 成为优势菌种; 通过给药治疗后, 两治疗组中的 *Lactobacillus* spp. 数量均有所回升, 超微 50% 量七味白术散治疗组的乳酸菌数量恢复效果优于传统七味白术散治疗组。

### 2.3 各组别中乳酸菌及屎肠球菌所占比例

各组别中乳酸菌和屎肠球菌所占比例如表 2 所示, 正常组中乳酸菌比例达到 61.90%, 抗生素造模使得乳酸菌比例明显下降, 屎肠球菌比例上升; 给药治疗后, 两治疗组的乳酸菌比例均有所上升, 且超微 50% 量七味白术散治疗组中乳酸菌的比例与正常组更为接近, 但该组的屎肠球菌比例下降不明显。

### 2.4 肠道中乳酸菌的主要种属及其所占比例

如图 1 所示, BLAST 分析发现, 正常小鼠肠道中的乳酸菌主要为 *Lactobacillus johnsonii* C37An9、*Lactobacillus johnsonii* NCC533、*Lactobacillus johnsonii* DPC6026 和 *Lactobacillus johnsonii* FI9785, 模型组(即自然恢复组)中 *Lactobacillus johnsonii*

C37An9 和 *Lactobacillus johnsonii* DPC6026 比例均有所下降, 其中 *Lactobacillus johnsonii* DPC6026 甚至降为 0; 在经过药物治疗后, *Lactobacillus johnsonii* C37An9 和 *Lactobacillus johnsonii* DPC6026 的比例均有所上升, 其中传统七味白术散治疗组中的 *Lactobacillus johnsonii* C37An9、*Lactobacillus johnsonii* NCC533 和 *Lactobacillus johnsonii* DPC6026 所占比例与正常组最为接近; 超微 50% 量七味白术散治疗组中的 *Lactobacillus johnsonii* DPC6026 所占比例与正常组最为接近。

### 2.5 各处理组多样性指数分析

Shannon-Wiener 多样性指数( $H'$ )包含 2 个因素: 反映物种数目的丰富度( $S$ )和均匀度( $E$ )。  $H'$ 、 $S$ 、 $E$  三者呈正相关, 微生物种类数目多可增加多样性; 同样, 种类之间个体分配均匀性增加也会使多样性提高。Simpson 优势度指数( $D'$ )表示物种优势度,  $D'$  值越大优势度越高。由图 2 可知, 过量使用抗生素

表 2 乳酸菌及屎肠球菌所占百分比

Table 2 The percentage of *Lactobacillus* spp. and *Enterococcus faecium* (%)

Groups	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>
The normal group	61.90	19.04
The model group	22.72	31.82
The group treated with traditional Qiweibaizhu powder	40.91	13.64
The group treated with 50% the amount of ultra-shattered Qiweibaizhu powder	57.14	28.57

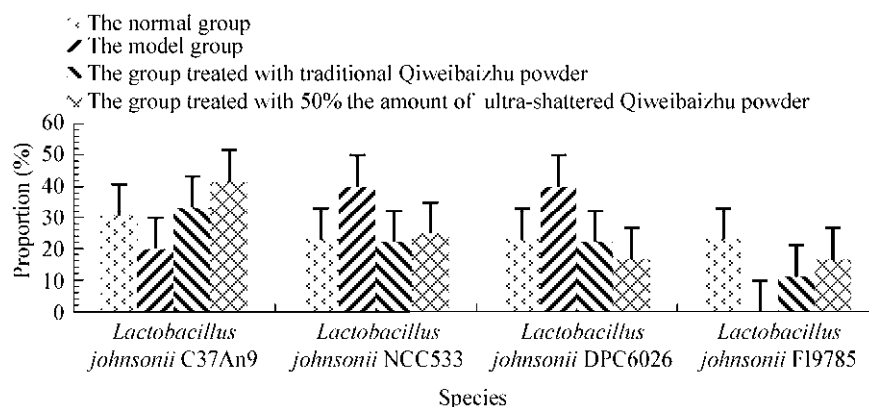


图 1 各组中 *Lactobacillus* spp. 不同菌株所占比例

Figure 1 The proportion of different strains of *Lactobacillus* spp. in each group

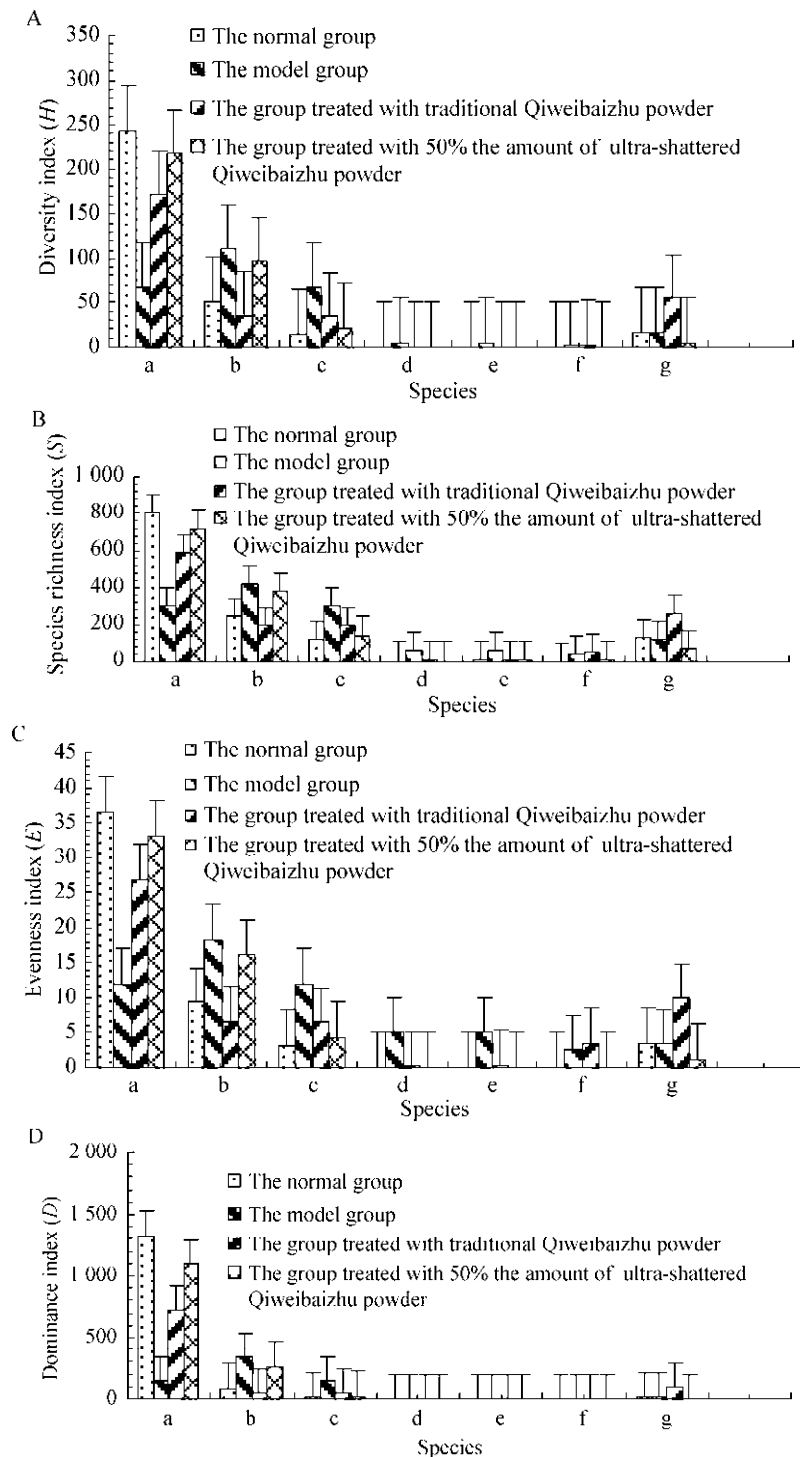


图 2 不同处理组肠道细菌的多样性指数

**Figure 2 The dominance index of intestinal bacteria in different treatment groups**

Note: A: Diversity index ( $H'$ ); B: Species richness index ( $S'$ ); C: Evenness index ( $E'$ ); D: Dominance index ( $D'$ ). a: *Lactobacillus* spp.; b: *Enterococcus faecium*; c: *Clostridium* spp.; d: *Blautia producta*; e: *Anaerostipes* spp.; f: *Staphylococcus saprophyticus*; g: Uncultured bacterium.

使肠道中 *Lactobacillus* spp. 的生长明显受到了抑制, *Blautia product*、*Anaerostipes* spp.、*Staphylacoccus saprophyticus* 等条件致病菌的生长开始占优势, 使 *Lactobacillus* spp. 的多样性、丰富度、均匀度及优势指数均下降, 且经过药物治疗后 *Lactobacillus* spp. 的各项指数均有所上升, 其中超微 50% 量七味白术散治疗组的恢复效果要优于传统七味白术散治疗组。

## 2.6 各组肠道菌群聚类树

采用 SPSS 20.0 软件处理数据构建聚类树, 结果见图 3。由图 3 可知, 4 个组聚成 3 个类群。第 1 类群为正常组和超微 50% 量七味白术散治疗组, 占 50%; 第 2 类群为传统治疗组, 占 25%; 第 3 类群为模型组, 占 25%。正常组和超微 50% 量七味白术散治疗组聚为一类, 说明经过超微 50% 量七味白术散治疗后, 小鼠肠道中菌群的种类和数量与正常组最接近, 两组间肠道菌群的多样性最接近, 即超微 50% 量七味白术散汤剂的效果要优于传统汤剂。

## 3 讨论与结论

肠道菌群对人体和动物的生长发育及抵抗疾病具有重要意义。过量使用抗生素或应激等因素会破坏已建立的肠道微生物区系平衡关系, 如乳酸杆菌趋于减少而大肠杆菌增加; 应激引起激素水平的

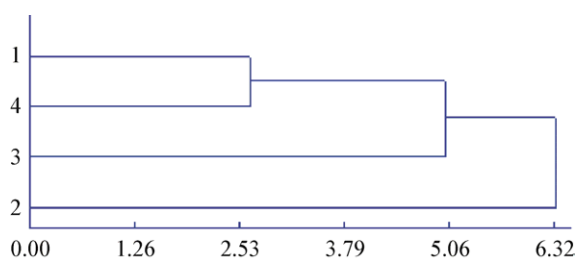


图 3 各组肠道菌群聚类树

Figure 3 Intestinal flora of each group

注: 1: 正常组; 2: 模型组; 3: 传统七味白术散治疗组; 4: 超微 50% 量七味白术散治疗组。

Note: 1: The normal group; 2: The model group; 3: The group treated with traditional Qiweibaizhu powder; 4: The group 50% amount of ultra-shattered Qiweibaizhu powder.

变化可影响肠绒毛分泌物的产生, 从而影响附着的微生物。一旦这些变化超过人体和动物生理范围时, 则引起消化道菌群之间的平衡改变, 微生态平衡被打破, 进而表现出病理状态, 如腹泻等。上述不利影响可以使用益生菌来加以改变, 使之重新建立完整的肠道微生物群系, 使肠内菌群正常化, 抑制病原菌如大肠杆菌、沙门氏菌及梭状杆菌等, 促使乳酸杆菌等有益菌增殖, 保持健康的肠道内菌群平衡<sup>[22]</sup>。

通过构建 16S rRNA 基因克隆文库分析正常组的肠道菌群可知, 肠道内的正常菌群以乳酸菌为主要优势菌, 乳酸菌是一群杆状或球状的革兰氏阳性细菌, 是人体和动物肠道内必不可少的益生菌。菌群失调腹泻小鼠肠道内乳酸菌大量减少, 屎肠球菌数量明显上升成为优势菌种, 通过七味白术散治疗后乳酸菌数量明显上升。有研究表明<sup>[23]</sup>, 七味白术散对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、产气杆菌等致病菌的生长均有抑制作用, 对肠道酵母菌有一定的促进作用, 而酵母菌能刺激肠黏膜分泌分泌型 IgA 和其他免疫球蛋白等物质, 可促进乳酸杆菌的生长。乳酸菌能阻止病原菌对肠道的入侵和定殖, 抑制病原菌和抗感染, 维持肠道的微生态平衡, 预防和抑制肿瘤的发生, 增强机体免疫力, 促进消化, 合成氨基酸和维生素, 降低胆固醇, 抑制内毒素的生产, 延缓衰老和抗辐射等<sup>[24]</sup>。大量事实证明<sup>[25-27]</sup>, 只要肠道中乳酸杆菌的数量减少或丢失, 出现菌群失调, 就可能引起疾病的发生; 只要肠道中乳酸杆菌的数量增加, 区系得到平衡, 就可以促进机体健康和治疗某些疾病。可见, 增加机体肠道中乳酸杆菌数量是一种预防和治疗某些疾病的重要措施。七味白术散对乳酸菌等的调节作用可能是其治疗菌群失调腹泻的机理之一。

本研究应用 16S rRNA 基因克隆文库技术分别构建了正常组、模型组、七味白术散传统汤剂治疗组以及超微 50% 量七味白术散组肠道细菌 16S rRNA 基因克隆文库, 进一步明确了正常小鼠肠道中细菌群落的组成情况, 以及七味白术散对菌群失

调腹泻小鼠肠道细菌群落的恢复情况。但由于本研究只对细菌的 16S rRNA 基因克隆文库进行了构建,对肠道中的其他微生物类群(如真菌等)还未能全面认识,需进一步研究。因此,为探明七味白术散对菌群失调腹泻小鼠肠道微生物的恢复情况,还需综合分析各种肠道微生物多样性的构成,从而进一步为七味白术散的临床应用提供可靠依据。

## REFERENCES

- [1] Qin JJ, Li RQ, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing[J]. *Nature*, 2013, 464(7285): 59-65
- [2] Gill SR, Pop M, DeBoy RT, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome[J]. *Science*, 2006, 312(5778): 1355-1359
- [3] Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, et al. Gut microbiota in health and disease[J]. *Physiological Reviews*, 2010, 90(3): 859-904
- [4] Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, et al. The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view[J]. *Cell*, 2012, 148(6): 1258-1270
- [5] Bercik P, Collins SM, Verdu EF. Microbes and the gut-brain axis[J]. *Neurogastroenterology & Motility*, 2012, 24(5): 405-413
- [6] Round JL, O'Connell RM, Mazmanian SK. Coordination of tolerogenic immune responses by the commensal microbiota[J]. *Journal of Autoimmunity*, 2015, 34(3): J220-J225
- [7] Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(34): 13780-13785
- [8] Willing B, Halfvarson J, Dicksved J, et al. Twin studies reveal specific imbalances in the mucosa-associated microbiota of patients with ileal crohn's disease[J]. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2009, 15(5): 653-660
- [9] Dumas ME, Barton RH, Toye A, et al. Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(33): 12511-12516
- [10] Lewis K, Lutgendorff F, Phan V, et al. Enhanced translocation of bacteria across metabolically stressed epithelia is reduced by butyrate[J]. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2010, 16(7): 1138-1148
- [11] Guo KX, Tan ZJ, Xie MZ, et al. The synergic effect of ultra-micro powder qiweibaizhusan combined with yeast on dysbacteriotic diarrhea mice[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2015, 21(1): 61-67 (in Chinese)  
郭抗萧, 谭周进, 谢梦洲, 等. 超微七味白术散与酵母菌协同治疗小鼠菌群失调腹泻[J]. *应用与环境生物学报*, 2015, 21(1): 61-67
- [12] Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, et al. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(9): 635-645
- [13] Lidbeck A, Gustafsson JÅ, Nord CE. Impact of lactobacillus acidophilus supplements on the human oropharyngeal and intestinal microflora[J]. *Scandinavian Journal of Infectious diseases*, 1987, 19(5): 531-537
- [14] Tan ZJ, Wu H, Liu FL, et al. Effect of ultra-micro powder Qiweibaishusan on the intestinal microbiota and enzyme activities in mice[J]. *Acta Ecology Sinica*, 2012, 32(21): 6856-6863 (in Chinese)  
谭周进, 吴海, 刘富林, 等. 超微七味白术散对肠道微生物及酶活性的影响[J]. *生态学报*, 2012, 32(21): 6856-6863
- [15] Huan MH, Chen F, Wu HY, et al. Construction and initial screening of gene library of the *Streptomyces ahgrosopicus*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2009(1): 134-137 (in Chinese)  
桓明辉, 陈飞, 吴红艳, 等. 不吸水链霉菌基因文库的构建及初步筛选[J]. *生物技术通报*, 2009(1): 134-137
- [16] Zeng A, Zhang HL, Tan ZJ, et al. The construction of mice diarrhea model due to dysbacteriosis and curative effect of ultra-micro Qiweibaizhusan[J]. *Microbiology China*, 2012, 39(9): 1341-1348 (in Chinese)  
曾奥, 张华玲, 谭周进, 等. 小鼠菌群失调腹泻模型的建立及超微七味白术散的疗效[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(9): 1341-1348
- [17] Zhong H, Lai XL, Wei RP, et al. An improved protocol for DNA extraction from the faeces of the giant panda[J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2003, 49(5): 670-674 (in Chinese)  
钟华, 赖旭龙, 魏荣平, 等. 一种从大熊猫粪便中提取 DNA 的改进方法[J]. *动物学报*, 2003, 49(5): 670-674
- [18] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. *Short Protocols in Molecular Biology*[M]. 5th ed. New York, NY: Current Protocols, 2002: 55
- [19] Wu H, Zhou SN, Guo C, et al. A metagenome DNA extracting method of intestinal flora in mice for molecular diversity analysis based on PCR technology[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2012, 24(7): 648-651 (in Chinese)  
吴海, 周赛男, 郭纯, 等. 一种基于 PCR 分析多样性的小鼠肠道微生物宏基因组提取方法[J]. *中国微生态学杂志*, 2012, 24(7): 648-651
- [20] Morgenstern I, Powlowski J, Ishmael N, et al. A molecular phylogeny of thermophilic fungi[J]. *Fungal Biology*, 2012, 116(4): 489-502
- [21] White TJ, Bruns T, Lee S, et al. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes[A]//Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, et al. *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*[M]. New York: Academic, 1990: 15-22
- [22] Salminen S, Ouwehand A, Benno Y, et al. Probiotics: how should they be defined?[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 1999, 10(3): 107-110
- [23] Jiang J, Guo KX, Long L, et al. Inhibiting effect of



- ultra-micro powder Qiweibaizhusan on bacteria *in vitro*[J]. Chinese Journal of Information on TCM, 2013, 20(11): 28-30 (in Chinese)
- 蒋婕, 郭抗萧, 龙玲, 等. 超微七味白术散体外抑菌作用研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2013, 20(11): 28-30
- [24] Lidbeck A, Nord C. Impact of lactobacillus acidophilus supplements on the human oropharyngeal and intestinal microflora[J]. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 1987, 19(5): 531-537
- [25] Gao QX, Wu TX, Wang JB, et al. Advance in research on symbiotic relationship between intestinal bacterial and their host[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2013, 22(3): 519-526 (in Chinese)
- 高权新, 吴天星, 王进波. 肠道微生物与寄主的共生关系研究进展[J]. 动物营养学报, 2013, 22(3): 519-526
- [26] Wei W. Study on bacterial diversity in retting system of Heilongjiang province by DGGE technique[D]. Harbin: Heilongjiang University, 2007: 54-55 (in Chinese)
- 魏薇. 利用 DGGE 技术研究黑龙江省各地沤麻系统中细菌多样性[D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2007: 54-55
- [27] Sun Y, Li XT, Yin SL. Effect of intestinal microecological environment on internal metabolism of traditional Chinese herbs[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2001, 32(4): 375-377 (in Chinese)
- 孙艳, 李雪驼, 殷素兰. 肠道内微生态环境对中草药体内代谢的影响[J]. 中草药, 2001, 32(4): 375-377

## 征 稿 简 则

### 1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、专栏等。

### 2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

### 3 写作要求

3.1 来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.2 英文摘要写作注意事项: (1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者所得; (2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; (3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; (4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。(5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; (6) 在英文摘要中不要使用中文字体标点符号。

3.3 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如“基因”、“表达”等。

3.4 脚注(正文首页下方):

Foundation items:

\*Corresponding author: Tel: ; E-mail:

Received: January 01, 20xx; Accepted: March 01, 20xx; Published online (www.cnki.net): March 31, 20xx

基金项目: 基金项目(编号)

\*通信作者: Tel: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-01-01; 接受日期: 20xx-03-01; 网络首发日期(www.cnki.net): 20xx-03-31

(下转 p.1596)