

## 高通量测序和实时荧光定量 PCR 分析何首乌肝损伤与肠道微生物组的关系

邓红<sup>1,2</sup>, 吴纯启<sup>2</sup>, 赵春雪<sup>3</sup>, 许赫雷<sup>1,2</sup>, 井潇<sup>1,2</sup>, 董延生<sup>2</sup>, 唐春萍<sup>1</sup>, 杨威<sup>4\*</sup>, 王全军<sup>2\*</sup>, 江涛<sup>5\*</sup>

1. 广东药科大学 中药学院, 广东 广州 510006

2. 军事医学科学院毒物药物研究所 国家北京药物安全评价研究中心 抗毒药物与毒理学国家重点实验室, 北京 100850

3. 天津市武清区人民医院 药剂科, 天津 301700

4. 广东省生物资源应用研究所 广东省动物保护与资源利用重点实验室 广东省野生动物保护与利用公共实验室, 广东 广州 510260

5. 广东药科大学 实验动物中心, 广东 广州 510006

**摘要:** **目的** 采用 Illumina 高通量测序技术和实时荧光定量 PCR (Real-Time PCR, RT-PCR) 法研究何首乌 (PM) 致肝损伤与肠道微生物组间的关系, 并验证两种定量方法的一致性。 **方法** 雄性 SD 大鼠随机分为 5 组: 对照组、脂多糖 (LPS) 组、LPS+对乙酰氨基酚 (APAP) 组、PM 组和 LPS+PM 组; 大鼠尾 iv 给予 4.0 mg/kg LPS 建立肝损伤模型, 各组相应每天 1 次 ig 给予 0.625 g/kg APAP 和 12 g 生药/kg PM, 记录大鼠体质量; 分别于造模后 2、14 h、5 和 8 d, 对大鼠粪便中细菌 16S rRNA 基因的 V4 高变区进行 Illumina 高通量测序, 根据测序结果得出的差异物种, 采用 RT-PCR 进行验证; 取造模后 8 d 大鼠肝脏组织, HE 染色, 光学显微镜观察。 **结果** 大鼠肝脏病理学检查结果显示, 与对照组比较, LPS 组大鼠存在肉芽肿, PM 组无异常病变; 与 LPS 组比较, LPS+PM 大鼠肝细胞出现轻度变性和微小肉芽肿增多, LPS+APAP 组可见微小肉芽肿和淋巴细胞浸润。 Illumina 高通量测序结果提示, 与对照组比较, 随着 PM 给药次数增加, 单独给予 PM 的大鼠肠道微生物无显著变化; LPS+PM 组表现为肠球菌科和毛螺旋菌科细菌逐渐增加, 乳杆菌属细菌减少, 且与 LPS 组有差异; RT-PCR 结果显示, 与对照组比较, 随着 PM 给药次数的增加, 单独给予 PM 的大鼠肠道微生物无显著变化; LPS+PM 组肠球菌科、毛螺旋菌科细菌数显著增加 ( $P < 0.05$ ), 乳杆菌属细菌数显著减少 ( $P < 0.05$ ), 且与 LPS 组比较有显著差异。 **结论** PM 肝损伤大鼠存在不同程度的菌群失衡, 且 Illumina 高通量测序和 RT-PCR 检测结果具有良好的一致性, 但 Illumina 高通量测序技术可获得更多的微生物信息, 更具优势。

**关键词:** 高通量测序; 实时荧光定量 PCR; 何首乌; 肝损伤; 肠道微生物组

**中图分类号:** R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2017)04-0464-08

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.04.006

## Study on relationship between *Polygonum multiflorum* induced liver injury and gut microbiota by High-throughput sequencing and Real-time PCR

DENG Hong<sup>1,2</sup>, WU Chun-qi<sup>2</sup>, ZHAO Chun-xue<sup>3</sup>, XU He-lei<sup>1,2</sup>, JING Xiao<sup>1,2</sup>, DONG Yan-sheng<sup>2</sup>, TANG Chun-ping<sup>1</sup>, YANG Wei<sup>4</sup>, WANG Quan-jun<sup>2</sup>, JIANG Tao<sup>5</sup>

1. School of Chinese Material Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. National Beijing Center for Drug Safety Evaluation and Research, State Key Laboratory of Medical Countermeasures and Toxicology, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

3. Department of Pharmacy, Wuqing District People's Hospital, Tianjin 301700, China

4. Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization, Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Guangdong Institute of Applied Biological Resources, Guangzhou 510260, China

5. Center of Laboratorial Animals, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

收稿日期: 2016-12-27

基金项目: 重大新药创制科技重大专项 (2013ZX09302303; 2012ZX09301003-001-008); 北京市科委基金项目 (Z131100006513010); 广东省科学院创新药物安全性评价研究团队 (2016GDASRC-0104)

作者简介: 邓红 (1991—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药药效与安全性评价。Tel: 18519101524 E-mail: denghongyes@163.com

\*通信作者 江涛, 教授, 研究方向为中药药理与毒理学。Tel: (020)39352996 E-mail: tjjiang66@21cn.com

王全军, 研究员, 研究方向为毒理学与药物临床前安全性评价。Tel: (010)66931631 E-mail: wangquanjunbeijing@163.com

杨威, 教授级高级工程师, 研究方向为药理毒理学。Tel: (020)22698388 E-mail: yangwei0719@163.com

**Abstract: Objective** To study the relationship between *Polygonum multiflorum* (PM) induced liver injury and gut flora by Illumina high-throughput sequencing and Real-time PCR (RT-PCR). **Methods** Male SD rats were randomly divided into control group, LPS group, LPS + acetaminophen (APAP) group, PM group and LPS + PM group. Rats were iv administered with 0.004 g/kg LPS in tail to make liver injury model. Rats in corresponding group were ig administered with 0.625 g/kg APAP and 12 g/kg (crude drug) PM once a day, record the body weight of rats at the same time. Illumina high-throughput sequencing was used to sequence the V4 hypervariable region of 16S rRNA gene of rat fecal bacteria. According to the results of the sequencing of different species, taken the RT-PCR to test and verify the biomarker, observed the relationship between PM induced liver injury and gut flora, and compared the consistency of the two methods. The liver tissue of rats was stained with HE and observed by optical microscope 8 d after modeling. **Results** Histopathological analysis revealed that, compared to control group, LPS group existed some microgranuloma, PM group have no significances; Compared to LPS group, LPS + PM group induced mild degeneration of liver cells and increased the number of microgranuloma, LPS + APAP group existed some micro granuloma and lymphocytes infiltration. Illumina high-throughput sequencing showed that, compared to control group, as the times of taking PM, the bacterium number of *Enterococcaceae* and *Lachnospiraceae* increased, while the *Lactobacillus* decreased in LPS + PM group, and had a difference LPS with group. The RT-PCR showed the bacterium number of *Enterococcaceae* and *Lachnospiraceae* increased, while the *Lactobacillus* decreased in LPS + PM group, compared to control group, and had an obvious difference with LPS group. **Conclusion** The liver injury rats' gut flora induced by PM show imbalance to some extent, and the two methods apply in quantitative analysis shows a good consistency, while Illumina high-throughput sequencing obtains more information about microbiota and has a greater advantage than RT-PCR.

**Key words:** High-throughput sequencing; Real-time PCR; *Polygonum multiflorum* Thunb.; liver injury; gut microbiota

何首乌为蓼科 (*Polygonaceae*) 植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. (PM) 的干燥块根<sup>[1]</sup>, 目前多用于临床用药、美容和营养保健产品等。近年来, PM 肝损伤的报道屡见不鲜<sup>[2-5]</sup>, 国家食品药品监督管理局也发出 PM 可导致肝损伤风险的警告信息<sup>[6]</sup>, 自此加大了人们对 PM 肝损伤的研究<sup>[7]</sup>。因 PM 的成分复杂、毒性作用机制研究不够明确, 目前国内不同研究机构对此尚未形成统一认识。

肝脏是机体最大的代谢器官, 肝脏和肠道在生理和解剖学上存在着紧密的联系。当肠道黏膜受损, 肠道失调的菌群和内毒素会大量进入肝脏激发并释放各种细胞因子和炎症介质, 使肝脏发生损伤<sup>[8]</sup>; 当肝功能发生障碍时, 也影响着肠道, 有研究采用  $\text{CCl}_4$  致大鼠急、慢性肝损伤, 均出现肠球菌和肠杆菌等增加的肠道微生态紊乱现象<sup>[9]</sup>。说明肝脏和肠道互相影响, 而肠道的改变又会影响到肠道微生物。所以本研究以肠道菌群为出发点, 研究 PM 的肝损伤与肠道微生物组间的关系。

肠道微生物组是指栖息在机体肠道的全部微生物的总和, 可参与机体营养吸收、黏膜保护和肠道免疫等过程<sup>[10]</sup>。已有研究报道, 肠道微生物与炎症性肠病、肥胖症、2 型糖尿病和帕金森<sup>[11-14]</sup>等疾病有关。目前常用的肠道微生物的检测方法主要有传统培养法、变性梯度凝胶电泳 (Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 法、定量 PCR (RT-PCR) 法、新一代测序 (Next-generation Sequencing, NGS)

技术和宏基因组 (Metagenomics) 技术等。传统培养法耗时费力, 目前一般用于对细菌特征形态的观察; DGGE 法是一种不依赖培养技术的方法, 可全面监测微生物群落的动态变化, 但是只能反映菌落中优势菌群的改变<sup>[15]</sup>; RT-PCR 法是目前常用的定量方法, 可用于研究微生物区系的变化, 了解微生物的动态变化过程, 但是此法受荧光素种类和检测光源的限制, 还需与其他的研究方法配合使用<sup>[16]</sup>; NGS 技术, 又称为第二代测序技术, 是目前常用的基因测序技术, 以 Illumina 公司的 Solexa 为代表的新一代高通量测序技术广泛应用于微生物学的研究, 可以检测菌落中低丰度菌群的变化, 比较适合于肠道微生态中物种多样性和丰富度的菌群分析, 是一种性价比较高的方法<sup>[17]</sup>; 宏基因组技术可以检测更低丰度的菌落变化, 获得更多的微生物信息, 但是此法目前测序价格昂贵<sup>[18]</sup>。因此, 选择合适的研究方法有利于对实验进行全面的分析和探索。

本研究在实验室前期研究的基础上, 收集大鼠药物处理后不同时间点的粪便样本, 采用 Illumina 高通量测序技术对大鼠粪便样本中的 16S rDNA 上的高变区 V4 区进行定性和定量研究, 同时采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 对测序得出的主要差异物种进行定量分析, 全面分析 PM 肝损伤大鼠肠道微生态的改变, 并进一步揭示 PM 的肝损伤与肠道微生物组间的关系, 为 PM 的临床安全、科学用药提供参考和依据。

## 1 材料

### 1.1 药物与主要试剂

PM 购自北京绿野药业有限公司, 批号 15090704, 经解放军 302 医院肖小河研究员鉴定为何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根, 按照文献<sup>[19-20]</sup>处理得终质量浓度为 2.4 g/mL PM 醇溶液; 对乙酰氨基酚 (APAP, 阳性药, 国药集团化学试剂有限公司, 批号 74SJBK); 脂多糖 (LPS, Simga 公司, 批号 025M4040V)。

粪便中微生物总 DNA 提取试剂盒 QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit (德国 QIAGEN 公司, 批号 151046496); RT-PCR 引物 (由上海生工生物工程股份有限公司合成); RT-PCR 标准质粒 DNA (由广州复能基因有限公司完成); SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (购自 TAKARA 公司, 批号 AK9302)。

### 1.2 动物

SPF 级 SD 大鼠, 雄性, 体质量 170~190 g, 购自北京维通利华实验动物科技有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2012-0001。饲养于军事医学科学院国家北京药物安全评价研究中心 (NBCDSER) GLP 实验室, 12 h/12 h 明暗交替, 温度 20~24 °C, 湿度 40%~70%, 自由饮食、水。NBCDSER 已通过国际实验动物评估和认可委员会 (AAALAC) 认证。所有动物适应性饲养 3 d 后供试。

### 1.3 主要仪器

HH-2 型数显恒温水浴锅 (常州国华电器有限公司); Centrifuge 5415D 离心机 (Eppendorf 公司); RT-PCR 仪 Real-Time PCR Detection System (Bio-rad 公司, 型号 CFX96); Ms2 Minishaker 涡旋震荡仪 (德国 IKA 集团); MILLI-Q 超纯水系统 (美国 Millipore 公司)。

## 2 方法

### 2.1 肝损伤模型的建立及分组给药

102 只雄性 SD 大鼠随机分为 5 组: 对照组、LPS 组、LPS+APAP 组、PM 组和 LPS+PM 组, 每组 6 只。参照本课题组前期方法<sup>[18-20]</sup>, 除对照组和 PM 组, 其他各组大鼠尾 iv 给予 4.0 mg/kg LPS, 建立 PM 肝损伤模型。从大鼠尾 iv 给予 LPS 后开始计时, 共分为 4 个时间点: 造模后 2、14 h, 5、8 d, 其中造模后 2 h 只有对照组和 LPS 组, 其他 3 个时间点均含以上 5 组。2 h 后, 各组相应每天 1 次 ig 给予 0.625 g/kg APAP 和 12 g 生药/kg PM, 给药剂量设定参照文献<sup>[19-21]</sup>, 分别连续给药 14 h、5、7 d,

记录各组大鼠的体质量。

### 2.2 肝脏病理学检查

取第 8 天各组大鼠的肝脏组织, 大体观察后随机选取 3 只大鼠取肝脏组织, 4%多聚甲醛溶液固定, 取材, 脱水后石蜡包埋, 再切成 4 μm 薄片, 常规苏木素-伊红 (HE) 染色, 光学显微镜观察。

### 2.3 粪便样本的采集及总 DNA 提取

分别取 2、14 h、5、8 d 对照组、LPS 组、PM 组和 LPS+PM 组大鼠结肠至直肠部分的粪便样本, 立即收集于冻存管并置于液氮中, 实验结束后立即转移至 -80 °C 冰箱保存待测。

粪便中微生物总 DNA 的提取严格按照 QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit 试剂盒的操作步骤进行。

### 2.4 Illumina 高通量测序技术

采用 Illumina 高通量测序技术, 基于 Illumina HiSeq PE250 测序平台, 对 16S rRNA 基因的 V4 高变区进行测序分析, 所用引物为 515F: 5'-GTGCCA GCMGCCGCGGTAA-3' 和 806R: 5'-GGACTACHV GGGTWTCTAAT-3'。

取“2.4”项提取的粪便中微生物总 DNA, 经质检合格后, 根据细菌 16S rRNA 基因 V4 高变区进行 PCR 扩增, 然后利用 Illumina HiSeq PE250 进行高通量测序; 构建小片段文库进行双末端 (Paired-End) 测序。此部分服务外包于北京诺禾致源生物信息科技有限公司完成。

### 2.5 荧光实时定量 PCR

经查阅文献<sup>[22]</sup>, 设计或参考 RT-PCR 所需特异性引物: 毛螺旋菌科、肠球菌科和乳杆菌属, 并在 BLAST 基因库 (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) 内比对引物序列的特异性 (见表 1)。

将标准质粒 DNA 进行梯度 (10 倍) 稀释, 分别得到毛螺旋菌科、肠球菌科和乳杆菌属拷贝数为  $3.62 \times 10^7 \sim 3.62 \times 10^2$ 、 $3.63 \times 10^7 \sim 3.63 \times 10^2$  和  $3.36 \times 10^7 \sim 3.36 \times 10^2$  的标准品, 并以  $\log_{10}$  为底拷贝数的对数为横坐标 (Y), 所得  $C_t$  值为纵坐标 (X) 作图得标准曲线方程: 肠球菌科标准曲线方程  $Y = -2.81662X + 37.49781$  ( $r^2 = 0.99532$ ); 毛螺旋菌科标准曲线方程  $Y = -2.79423X + 33.26415$  ( $r^2 = 0.98789$ ); 乳杆菌属标准曲线方程  $Y = -2.86271X + 34.18674$  ( $r^2 = 0.99292$ )。取“2.4”项所提取的粪便中微生物总 DNA, 经质检合格后, 作为 RT-PCR 待测 DNA 模板。RT-PCR 反应 20 μL 反应体系的构建: SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 10 μL, PCR 上下游

表1 RT-PCR引物序列  
Table 1 Primer sequence of Real-time PCR

细菌菌科	引物名称	引物序列 (5'-3')	产物片段大小/bp
毛螺旋菌科	Eub-F	ACT CCT ACG GGA GGC AGC	140
	Erec-R	GCT TCT TAG TCA RGT ACC G	
肠球菌科	Enter-F	CCC TTA TTG TTA GTT GCC ATC ATT	139
	Enter-R	ACT CGT TGT ACT TCC CAT TGT	
乳杆菌属	Lac-F	AGCGTTGTCCGGATTATTG	229
	Lac-R	CCATRCTTTCGAGCCTCAGC	

引物各 0.4  $\mu$ L, DNA 模板 1  $\mu$ L, 加灭菌蒸馏水补齐至 20  $\mu$ L; 反应条件: 预变性: 95  $^{\circ}$ C、30 s; PCR 反应: 95  $^{\circ}$ C、5 s; 60  $^{\circ}$ C 退火 30 s; 共 40 个循环, 反应结束后进行溶解曲线分析。将得到的  $C_t$  值代入标准曲线方程, 计算得拷贝数, 待测样品拷贝数最后换算成 1 g 粪便中所含有的总拷贝数。

## 2.6 统计学分析

本研究根据 Illumina HiSeq PE250 高通量测序的标准化操作规程进行操作。所得数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 运用 SPSS 19.0 软件进行数据分析, 采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 进行方差齐性检验, 方差齐时用 LSD 法进行组间比较, 方差不齐时用 Dunnett's T3 法进行组间比较。采用 GraphPad

Prism 6 软件进行作图分析。

## 3 结果

### 3.1 对大鼠体质量的影响

如表 2 所示, LPS 造模后, 与对照组比较, PM 组大鼠体质量无明显变化, 各时间点 LPS 组大鼠体质量显著下降 ( $P < 0.05$ ); 造模后 14 h, 与对照组比较, LPS+APAP 和 LPS+PM 组大鼠体质量显著下降 ( $P < 0.05$ ), 与 LPS 组比较差异不显著; 造模后 5 和 8 d, 与对照组比较, LPS+APAP 和 LPS+PM 组大鼠体质量显著下降 ( $P < 0.05$ ), 且造模后 5 和 8 d LPS+APAP、造模后 8 d LPS+PM 组与 LPS 组比较显著差异 ( $P < 0.05$ )。结果提示, 与 LPS 组比较, LPS+APAP 和 LPS+PM 可以抑制大鼠体质量的生长。

表2 各组大鼠在不同时间点体质量的变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Weigh changes of rats in each group at different time point ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	体质量/g			
		造模后 2 h	造模后 14 h	造模后 5 d	造模后 8 d
对照	—	213.28±3.45	216.25±4.88	230.38±5.18	246.63±10.35
LPS	0.004	205.68±4.46*	194.73±5.86*	195.82±1.60*	209.00±3.79*
LPS+APAP	0.004+0.625	209.22±3.78	194.27±4.15*	189.33±6.15*#	195.07±7.27*#
PM	12	209.43±7.29	214.50±3.20	228.88±4.86	240.87±6.63
LPS+PM	0.004+12	209.37±6.22	193.05±4.43* <sup>△</sup>	193.25±4.45* <sup>△</sup>	201.12±3.57* <sup>△</sup>

与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与 LPS 组比较: # $P < 0.05$ ; 与 PM 组比较: <sup>△</sup> $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs model group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  vs PM group

### 3.2 大鼠肝组织病理学的变化

造模后 8 d, LPS 组有 1 例 (1/3) 肝组织轻度肝损伤, LPS+APAP 组有 3 例 (3/3) 肝组织轻度变性, LPS+PM 组有 3 例 (3/3) 肝组织轻度损伤, 而对照组和 PM 组大鼠肝组织无损伤现象。根据各组大鼠肝组织病理学检查发现, 与对照组比较, PM 组肝组织病理检查无异常病变, LPS 组散在少量微小肉芽肿; 与 LPS 组比较, LPS+PM 组肝细胞出现轻度变性和微小肉芽肿增多, LPS+APAP 组可见微

小肉芽肿和淋巴细胞浸润。结果提示, LPS+APAP 和 LPS+PM 组给药可使肝脏组织发生病变, 出现肝损伤, 且 LPS+APAP 组肝损伤比 LPS+PM 组严重。结果见图 1。

### 3.3 Illumina 高通量测序检测肝损伤大鼠肠道菌群改变

通过对对照组、LPS 组、PM 组和 LPS+PM 组进行高通量测序分析: 经 LPS 诱导 2 h 后, 与对照组比较, LPS 组毛螺旋菌科细菌数显著减少 ( $P < 0.05$ ),

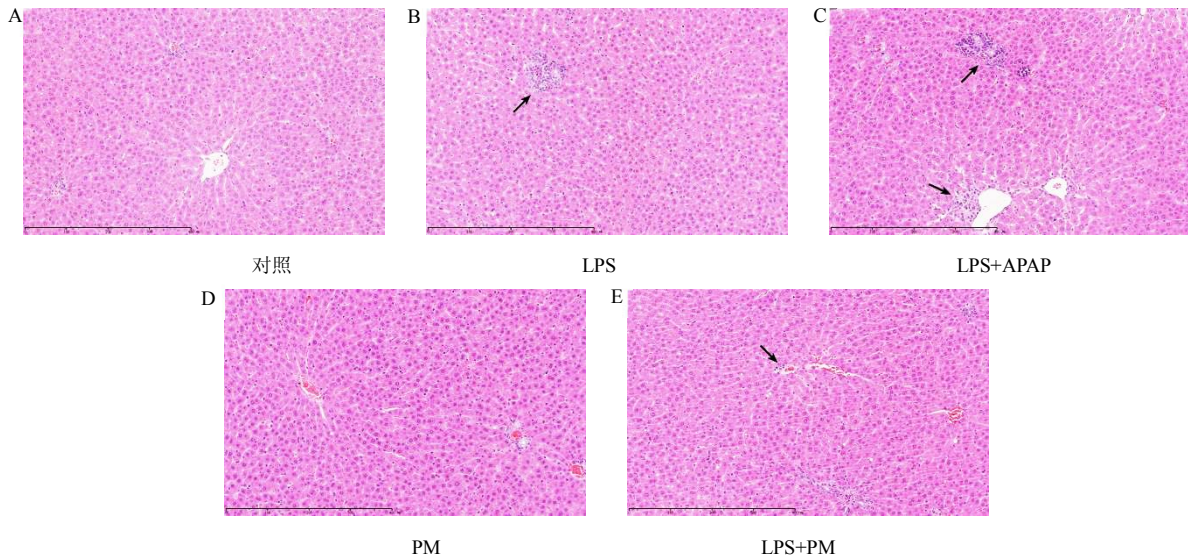


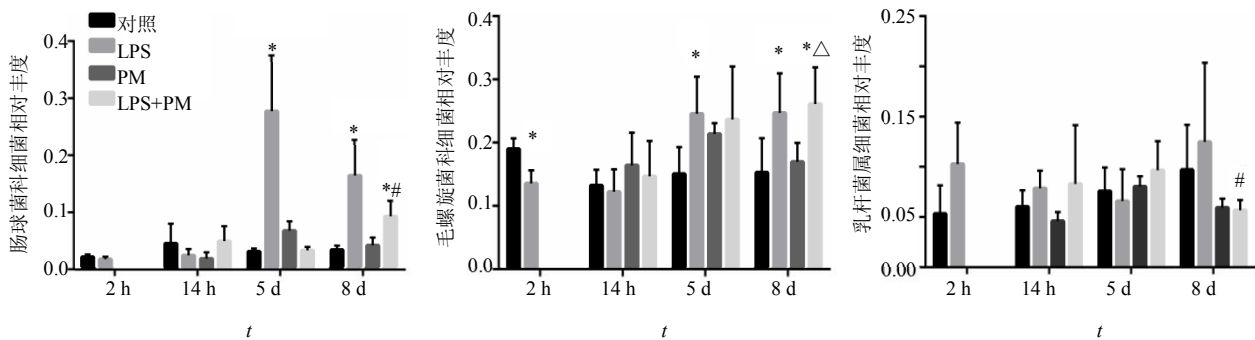
图 B 箭头指示散在的微肉芽肿；图 C 箭头指示有淋巴细胞浸润；图 E 箭头指示轻度变性的肝细胞  
 Arrow in Fig. B shows some microgranuloma; Arrows in Fig. C show that a number of lymphocytes infiltration; Arrows in Fig. E show mild degeneration of liver cells

图 1 各组大鼠肝组织病理学检查

Fig. 1 Histopathological changes of liver of rats in each group

乳杆菌属有所增加，肠球菌科无明显改变。造模 14 h 后，与对照组比较，PM 组和 LPS+PM 组大鼠肠道菌群无明显变化，且 LPS+PM 组与 LPS 组比较无明显差异；造模 5 d 后，与对照组比较，PM 组大鼠肠道菌群无明显改变，LPS+PM 组毛螺旋菌科细菌数有所增加，而 LPS 组表现为肠球菌科和毛螺旋菌科细菌数显著增加 ( $P < 0.05$ )；造模 8 d 后，与对照组比较，PM 组大鼠肠道菌

群无明显改变；LPS 组表现为 3 种菌属均增加，其中肠球菌科和毛螺旋菌科差异显著 ( $P < 0.05$ )；LPS+PM 组大鼠毛螺旋菌科、肠球菌科细菌数显著增加 ( $P < 0.05$ )，乳杆菌属细菌数有所减少，与 LPS 组比较差异显著 ( $P < 0.05$ )。结果提示，PM 的肝损伤可能与肠球菌科和毛螺旋菌科细菌数增加、乳杆菌属细菌数减少有关。结果见图 2。



与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与 LPS 组比较: # $P < 0.05$ ; 与 PM 组比较: △ $P < 0.05$   
 \* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs model group; △ $P < 0.05$  vs PM group

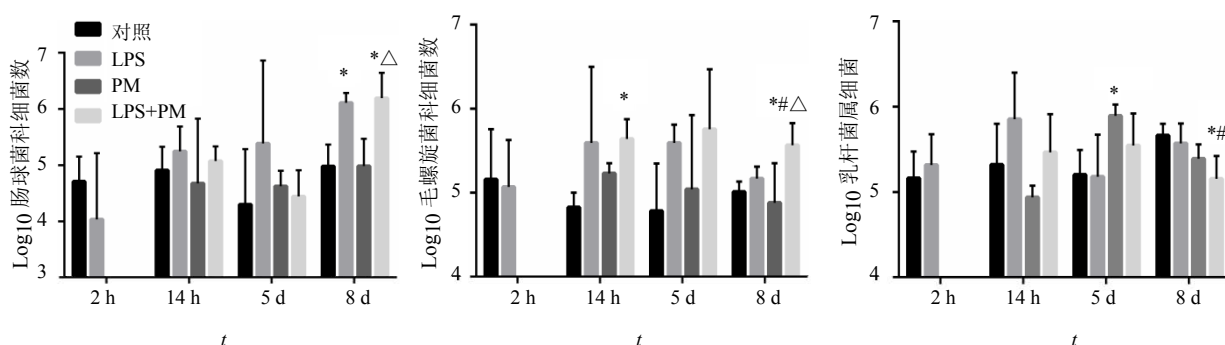
图 2 高通量测序分析各组大鼠在不同时间点肠球菌科、毛螺旋菌科、乳杆菌属细菌数的变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 2 Changes of bacterium number of *Enterococcaceae*, *Lachnospiraceae* and *Lactobacillus* of rats in each group at different time point detected by high-throughout sequencing ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

### 3.4 qRT-PCR 法检测肝损伤大鼠肠道菌群的变化

经 LPS 诱导 2 h 后, 与对照组比较, LPS 组大鼠肠道菌群无明显改变; 造模 14 h 后, 与对照组比较, PM 组大鼠肠道菌群无明显改变, LPS+PM 组表现为毛螺旋菌科细菌数显著增加 ( $P < 0.05$ ), 而 LPS 组毛螺旋菌科细菌数有所增加, 但差异不显著; 造模 5 d 后, 与对照组比较, PM 组大鼠肠道菌群无明显改变, LPS+PM 组表现为毛螺旋菌科细菌数有所增加, 与 LPS 组比较差异不显著; 造模 8 d 后,

与对照组比较, PM 组大鼠肠道菌群无明显改变, LPS+PM 组表现为肠球菌科、毛螺旋菌科细菌数显著增加 ( $P < 0.05$ ), 乳杆菌属细菌数显著减少 ( $P < 0.05$ ), 且与 LPS 组比较, 毛螺旋菌科和乳杆菌属细菌数有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。结果提示, LPS 联合 PM 给药所致的肝损伤可能与肠球菌科、毛螺旋菌科细菌数的增加和乳杆菌属细菌数的减少有关, 且与 Illumina 高通量测序技术的结果具有一致性。结果见图 3。



与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与 LPS 组比较: # $P < 0.05$ ; 与 PM 组比较:  $^{\Delta}P < 0.05$   
\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs model group;  $^{\Delta}P < 0.05$  vs PM group

图 3 RT-PCR 分析各组大鼠在不同时间点对肠球菌科、毛螺旋菌科、乳杆菌属细菌数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 3 Changes of bacterium number of *Enterococcaceae*, *Lachnospiraceae* and *Lactobacillus* of rats in each group at different time point detected by Real-time PCR ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

## 4 讨论

中药是中华民族的瑰宝, 由于人们对中药毒性认识不足, 临床上不能做到科学、合理的给药, 从而使得中药毒性事件频繁发生。中药 PM 因具有多种功效, 广泛应用于临床、美容和营养保健品, 但近年来频繁报道 PM 导致肝损伤的事件, 使得人们开始重视并加大研究 PM 的毒性及其毒性机制。

目前, 对于 PM 肝损伤动物模型的建立常采用时间长达 1~3 个月、剂量高达 40~60 g/kg 给药造模<sup>[23-25]</sup>。本课题组前期采用 LPS 诱导 SD 大鼠成功建立 PM 的肝损伤模型, LPS 是常用的免疫激活剂, 能直接激活机体免疫系统产生炎症介质, LPS 通过与 LPS 结合蛋白 (LBP) 结合, 再与 CD14 结合成 LPS-LBP-CD14 复合物, TLR4 识别此复合物, 启动 TLR4 介导的下游信号通路而发生肝损伤<sup>[26-27]</sup>。LPS 和某些药物联合使用可诱导药物产生类似于临床的药物性特异质肝损伤。Luyendy 等<sup>[28]</sup>采用 LPS 和临床可导致特异质肝损伤的药物雷尼替丁联合使用产生了肝损伤, 而 LPS 与不能产生特异质肝损伤的药

物法莫替丁联合使用却没有出现肝损伤。同样, Waring 等<sup>[29]</sup>发现 LPS 可使有特异质肝损伤的曲伐沙星出现肝损伤, 而左氧氟沙星未出现肝损伤。说明 LPS 诱导的动物模型可以作为评价研究药物特异质肝损伤的有效方法之一。本研究发现, LPS 联合 PM 给药可以抑制大鼠体质量的生长, 且大鼠肝脏病理检查可见微小肉芽肿增多和轻度肝细胞变性, 这与本课题组前期的研究结果相一致<sup>[19-21]</sup>, 说明了本研究成功建立 PM 肝损伤模型。

传统 PM 肝损伤研究多从细胞、分子水平去研究其毒性作用机制, 而肠道微生物组和分子生物学技术的发展为科研工作者提供了新的研究方向。Illumina 高通量测序技术和 qRT-PCR 法是目前常用的肠道微生物组研究方法。Illumina 高通量测序技术广泛用于某一特定微生物菌落的多样性、定性、定量研究, 是目前较常用的一种研究微生物的方法。qRT-PCR 法以其快捷、精准、不易污染样品等优点广泛用于分子定量实验。因此, 本研究以肠道菌群为出发点, 采用 Illumina 高通量测序技术和

qRT-PCR 法全面分析 PM 的肝损伤与大鼠肠道微生物组间的关系。本研究结果显示,随着 PM 给药次数的增多, LPS+PM 组大鼠表现为肠球菌科、毛螺旋菌科细菌数增多,乳杆菌属细菌数减少。

肠球菌科细菌是肠道的有害菌,被列为是引起医院感染的第一大病原菌<sup>[30]</sup>,它可引起菌血症、伤口感染和尿路感染等疾病,临床上常见于过度使用抗生素或者免疫力低下的患者<sup>[31-32]</sup>。有文献研究采用 CCl<sub>4</sub> 制备大鼠急、慢性肝损伤模型,采用传统培养法和 qRT-PCR 法研究发现,模型组大鼠均出现肠球菌科细菌数增多的现象<sup>[9]</sup>。这与本研究中 LPS+PM 组肠球菌科细菌数增多结果相一致。虽然肠球菌科是 LPS 组的差异物种,但是 LPS+PM 组大鼠肠道菌科细菌数随着给药次数的增加而增加,而 LPS 组表现为减少的趋势。因此可说明 LPS 联合 PM 给药组大鼠肠球菌科细菌数的增加与 LPS 的作用无关。毛螺旋菌科是机体的有益菌,它可参与肠道碳水化合物发酵分解成短链脂肪酸的过程,而机体的组织和肠道上皮细胞的重要营养来源就是短链脂肪酸<sup>[33]</sup>。此时,大鼠肠道中毛螺旋菌科细菌数的增加可能是机体为了抵制有害菌的增加而增加其数量,这与文献报道连续 90 d 给予大鼠喂食氟环唑使得大鼠出现肝损伤, Illumina 高通量测序得到的结果相一致<sup>[34]</sup>。乳杆菌属细菌是机体常见的有益菌,文献报道,肝脏发生障碍时,表现为乳杆菌属细菌数减少<sup>[35-36]</sup>,这与本研究结果相一致。

上述结果提示,PM 的肝损伤可能与肠球菌科、毛螺旋菌科细菌数的增加,乳杆菌属细菌数的减少有关。目前,关于 PM 的肝损伤与肠道菌群间关系的研究鲜有文献报道。本实验室后续将在本研究基础上,加大实验动物样本量、增加时间点或者采用医院收集的 PM 肝损伤患者的粪便样本,深入研究 PM 的肝损伤对肠道微生物结构和功能的改变。

综上所述,本研究成功建立 LPS 诱导 PM 的肝损伤模型,且采用 Illumina 高通量测序技术和 qRT-PCR 法研究发现,PM 的肝损伤大鼠表现为肠球菌科和毛螺旋菌科细菌数增加、乳杆菌属细菌数减少,两种方法表现出良好的一致性,但 Illumina 高通量测序技术可检测更低丰度的物种、获得更多的微生物信息。将微生物组学研究方法应用于中药药理毒理的研究,为中药药理毒理学的科研工作者提供了一种全新的方式,有助于认清中药的潜在毒性,加快中药现代化、国际化进程。

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 175-177.
- [2] Jung K A, Min H J, Yoo S S, et al. Drug- induced liver injury: twenty five cases of acute hepatitis following ingestion of *Polygonum multiflorum* Thunb. [J]. Gut Liver, 2011, 5(4): 493-499.
- [3] 吴嘉瑞, 马利彪, 董玲, 等. 何首乌不良反应与安全性探讨 [J]. 中国医药指南, 2012, 10(22): 270-271.
- [4] 梅雪, 余刘勤, 陈小云, 等. 何首乌化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(1): 122-131.
- [5] 俞捷, 谢洁, 赵荣华, 等. 何首乌肝脏不良反应研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1206-1210.
- [6] 马喆, 赵珺睿, 董冉冉, 等. 基于高内涵分析技术的何首乌提取物及其主要成分肝毒性研究 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4021-4029.
- [7] CFDA. 国家食品药品监管总局提示关注口服何首乌肝损伤风险 [EB/OL]. (2014-07-16) [2016-12-15]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0051/102902.html>.
- [8] Son G, Kremer M, Hines I N. Contribution of gut bacteria to liver pathobiology [J]. Gastroenterol Res Pract, doi: 10.1155/2010/453563. Epub 2010 Jul 28.
- [9] 胡锦涛. 实时定量 PCR 分析肠道正常菌群及其在实验性肝损伤研究中的初步应用 [D]. 重庆: 第三军医大学. 2008.
- [10] Purchiaroni F, Tortora M, Gabrielli M, et al. The role of intestinal microbiota and the immune system [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2013, 17(3): 323-333.
- [11] Manichanh C, Borrueal N, Casellas F A. The gut microbiota in IBD [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2012, 9(10): 599-608.
- [12] Naseer M I, Bibi F, Alqahtani M H, et al. Role of gut microbiota in obesity, type 2 diabetes and Alzheimer's disease [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2014, 13(2): 305-311.
- [13] Amar J, Serino M, Lange C, et al. Involvement of tissue bacteria in the onset of diabetes in humans: evidence for a concept [J]. Diabetologia, 2011, 54(12): 3055-3061.
- [14] Tan A H, Mahadeva S, Thalha A M, et al. Small intestinal bacterial overgrowth in Parkinson's disease [J]. Parkinsonism Relat Disord, 2014, 20(5): 535-540.
- [15] Gasta C J, Knowles C J, Wright M A, et al. Identification and characterisation of bacterial populations of an in-use metal-working fluid by phenotypic and genotypic methodology [J]. Int Biodeter Biodegr, 2001, 47(2): 113-123.
- [16] 许波, 杨富亚, 慕跃林, 等. 胃肠道微生物及其分子生态学技术研究进展 [J]. 微生物学通报, 2014, 41(1):

- 136-145.
- [17] Cox M J, Cookson W O, Moffatt M F. Sequencing the human microbiome in health and disease [J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(1): 88-94.
- [18] 季钧涛, 胡天惠. 宏基因组学及其在医药学中的应用 [J]. *海峡预防医学杂志*, 2011, 17(3): 18-19.
- [19] 谢丽华, 樊星, 吴纯启, 等. 何首乌乙醇提取液对LPS诱导大鼠肝脏CYP450酶的影响 [J]. *药物评价研究*, 2016, 39(2): 175-182.
- [20] 毛宏梅, 谢丽华, 樊星, 等. 何首乌醇提物对脂多糖诱导大鼠肝TLR4/TRIF/IRF-3信号通路的影响 [J]. *国际药学研究杂志*, 2016, 43(3): 496-503.
- [21] Fan X, Wang J B, Xie L H, et al. A new animal model for *Polygonum multiflorum* Thunb-induced liver injury in rats and its potential mechanisms [J]. *Toxicol Res*, 2015, 4(4): 1-13.
- [22] Jump R L, Polinkovsky A, Hurlless K, et al. Metabolomics analysis identifies intestinal microbiota-derived biomarkers of colonization resistance in clindamycin-treated mice [J]. *PLOS ONE*, 2014, 9(7): e101267.
- [23] 李奇, 赵奎君, 赵艳玲, 等. 大剂量何首乌醇提物致大鼠多脏器损伤研究 [J]. *环球中医药*, 2013, 6(1): 1-7.
- [24] Zhang Y, Ding T, Diao T, et al. Effects of *Polygonum multiflorum* on the activity of cytochrome P450 isoforms in rats [J]. *Pharmazie*, 2015, 70(1): 47-54.
- [25] Zhang Y, Wang N, Zhang M, et al. Metabonomics study on *Polygonum multiflorum* induced liver toxicity in rats by GC-MS [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(7): 10986-10992.
- [26] Wang H, Liu Y, Shi H, et al. Aspartate attenuates intestinal injury and in rabbits TLR4 and NODs/NF-kappaB and p38 signaling in weaned pigs after LPS challenges [J]. *Eur J Nutr*, 2016, 10(23): 234-245.
- [27] Morris M C, Gilliam E A, Li L. Innate immune programming by endotoxin and its pathological consequence [J]. *Front Immunol*, 2015, 5: 680.
- [28] Luyendyk J P, Lehman-McKeeman L D, Nelson D M, et al. Coagulation-dependent gene expression and liver injury in rats given lipopolysaccharide with ranitidine but not with famotidine [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 317(2): 635-643.
- [29] Waring J F, Liguori M J, Luyendyk J P, et al. Microarray analysis of lipopolysaccharide potentiation of trovafloxacin-induced liver injury in rats suggests a role for proinflammatory chemokines and neutrophils [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 316(3): 1080-1087.
- [30] Hidron A I, Edwards J R, Patel J, et al. NHSN annual updated: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007 [J]. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2008, 29(11): 996-1011.
- [31] Daniel D S, Lee S M, Dykes G A, et al. Public health risks of multiple-drug-resistant *Enterococcus* spp. In Southeast Asia [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(18): 6090-6097.
- [32] Guillet C V, Kollef M H. Treatment of gram-positive infections in critically ill patients [J]. *BMC Infect Dis*, 2014, 14: 92. doi: 10.1186/1471-2334-14-92.
- [33] Meijer K, de Vos P, Priebe M G. Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: what relevance for health [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2010, 13(6): 715-721.
- [34] Xu C, Liu Q, Huan F, et al. Changes in gut microbiota may be early signs of liver toxicity induced by Epoxiconazole in rats [J]. *Chemotherapy*, 2014, 60(2): 135-142.
- [35] Koga H, Tamiya Y, Mitsuyama K, et al. Probiotics promote rapid-turnover protein production by restoring gut flora in patients with alcoholic liver cirrhosis [J]. *Hepatol Int*, 2013, 7(2): 767-774.
- [36] Arora S, Kaur I P, Chopara K, et al. Efficiency of double layered microencapsulated to modulate pro-inflammatory molecular markers for the management of alcoholic liver disease [J]. *Mediators Inflamm*, 2014: 715130. doi: 10.1155/2014/715130. Epub 2014 May 22.