

高通量测序分析附子、红参不同比例配伍对大鼠肠道菌群的影响

唐志丹¹, 魏娟¹, 欧阳慧子², 何俊^{1*}

1. 天津中医药大学中药研究院, 天津市现代中药重点实验室, 天津 300193

2. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 3001930

摘要: **目的** 初步研究附子、红参不同比例配伍对大鼠肠道菌群的影响。**方法** 红参、附子分别采用8倍体积的70%乙醇加热回流提取2次, 每次1 h, 制备醇提物。将15只SD大鼠随机分成A、B、C3组, 每组5只, A组为附子醇提物单独给药组, 给药量为0.415 g/kg, B、C组分别为附子、红参配伍比例1:1(红参醇提物1.17 g/kg)和1:2(红参醇提物2.34 g/kg)给药组, 每天ig给药1次, 连续给药7 d。给药结束后, 于第8天收集大鼠粪便, 提取粪便中细菌的DNA, 对粪便菌群的16Sr-RNA的V4区进行扩增, 利用Miseq高通量测序平台进行基因序列的测定, 利用Uparse software对序列进行分析, 将相似性在97%以上的序列进行归并, 生成分类操作单元(OTU); 利用QIIME软件计算样品的菌群丰度指数(Ace、Chao1)、菌群多样性指数(Simpson、Shannon)。**结果** A组和B组的OTU数量较C组显著增多($P < 0.05$); A组和B组Ace、Chao1指数为1393、1368和1085、1057, C组Ace和Chao1指数为889和884, A组和B组较C组显著增多($P < 0.05$ 、0.01); 厚壁菌门、拟杆菌门和变形菌门均为3组样品中的优势菌门; 在属的水平上, C组中乳酸杆菌属和拟杆菌属含量较A组和B组增加。**结论** 红参与附子不同比例配伍可对大鼠肠道菌群产生显著的影响, 随红参比例的增加, 可能在一定程度上改善肠道的微生态环境。

关键词: 附子; 红参; 高通量测序; 肠道菌群; 乳酸杆菌属

中图分类号: R962.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2018)10-1781-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.10.006

Effect of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* and *Ginseng Radix Et Rhizoma Rubra* in different compounding ratio on gut microbiota in SD rats evaluated by high-throughput sequencing

TANG Zhidan¹, WEI Juan¹, OUYANG Huizi², HE Jun¹

1. Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. The First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To analyze the effect of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* (ALRP) and Red Ginseng in different compounding ratios on the intestinal microbiota of rats by using Miseq high-throughput sequencing technology. **Methods** Red Ginseng and ALRP were extracted by refluxing with 70% ethanol of eight times volume for two times, 1 h each time, to prepare ethanol extracts. Fifteen SD rats were randomly divided into A, B and C group, which were treated with ALRP ethanol extracts alone, ALRP and Red Ginseng in compounding ratio of 1:1 (Red Ginseng ethanol extracts 1.17 g/kg) and 1:2 (Red Ginseng ethanol extracts 2.34 g/kg) respectively, ig administrated once daily for 7 d. The fecal samples were collected on the 8th to extract bacterial DNA. The fecal bacteria composition was investigated by Miseq high-throughput sequencing of the V4 region of the 16Sr-RNA gene. Uparse Software was used to analyze the sequences, and the sequences with 97% similarity were merged to generate OTU, and QIIME Software was used to calculate the bacterial abundance index (Ace and Chao1) and bacterial diversity index (Simpson and Shannon). **Results** The number of OTUs in group A and group B was significantly higher than that in group C ($P < 0.05$); the Ace and Chao1 indices in group A and group B were 1393 and 1368, 1085 and 1057, and the Ace and Chao1 indices in group C were 889 and 884, while the A and B groups were significantly higher than that in group C ($P < 0.05$ and 0.01); *Fimicutes*, *Bacteroides* and

收稿日期: 2018-03-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81503457, 81673824)

第一作者: 唐志丹(1990—), 女, 硕士在读, 研究方向为药物分析。Tel: 18322128129 E-mail: 1578247336@qq.com

*通信作者: 何俊, 副研究员, 研究方向为药物分析, Tel: (022)59596163 E-mail: hejun673@163.com

Proteobacteria were the dominant phylum in the three groups; at the genus level, *Lactobacillus* and *Bacteroides* in group C were the dominant phylum. **Conclusion** ALRP and Red Ginseng in different compounding ratio have significant effect on gut microbiota. With the increase of the proportion of Red Ginseng, the intestinal microecological environment may be improved to a certain extent.

Key words: *Aconiti Lateralis Radix Praeparata*; *Ginseng Radix Et Rhizoma Rubra*; High-throughput sequencing; gut microbiota; *Lactobacillus*

附子具有强心、免疫调节和镇痛抗炎的作用^[1-3], 但因其毒性剧烈, 常与红参配伍使用, 起到减毒增效的功能^[4], 二者配伍常用于治疗心血管、呼吸系统和神经系统疾病^[5]。近年来, 中药配伍对肠道菌群的影响已经成为研究中药配伍机制的重要研究内容。动物肠道中栖息着数量巨大的微生物^[6-7], 影响着宿主的生理、代谢和免疫功能等^[8-9], 肠道菌群的失调会对肠道宿主功能产生不良影响^[10]。本实验采用高通量测序技术考察附子、红参不同比例配伍对大鼠肠道菌群的影响, 从改善肠道微生态环境的角度初步揭示附子、红参配伍用药减毒增效的作用机制, 为附子、红参配伍的临床用药提供参考依据。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级15只健康雄性SD大鼠, 平均体质量为(200±10)g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 实验动物生产许可证号SCXK(京)2014-0004。

1.2 药材及主要试剂

红参(批号YIJ-131101)、附子(批号140102)均由雅安三九药业有限公司提供, 经天津中医药大学中医药研究院何俊副研究员鉴定, 红参为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的栽培品经蒸制后的干燥根和根茎, 附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Dabx. 的子根的加工品。

凝胶提取试剂盒(Qiagen, Germany); Phusion 高保真PCR扩增混合物(New England Biolabs)。

1.3 主要仪器

Qubit 2.0 荧光仪(Thermo Scientific); Agilent Bioanalyzer 2100 system。

2 方法

2.1 红参、附子醇提物的制备

红参、附子分别采用8倍体积的70%的乙醇加热回流提取2次, 每次1h, 将各药材提取液分别合并, 浓缩干燥至粉, 计算提取率, 其中红参的提取率为43.36%, 附子的提取率为15.38%。红参提取物中含各人参皂苷的质量分数分别为: Rb₁ 1.30 mg/g、Rb₂ 1.93 mg/g、Rc 0.89 mg/g、Re 0.23 mg/g、Rd 0.26 mg/g、Rg₁ 0.19 mg/g、Rf 0.32 mg/g。附子提取物中所含各生

物碱的质量分数分别为: 乌头碱0.02 mg/g、次乌头碱0.09 mg/g、新乌头碱0.04 mg/g、苯甲酰乌头原碱0.46 mg/g、苯甲酰次乌头原碱1.08 mg/g、苯甲酰新乌头原碱1.68 mg/g。

2.2 动物分组及给药

附子醇提物给药量为0.415 g/kg(按照人临床生药给药剂量折算), 以附子给药量为基准, 设置附子、红参醇提物1:1(红参醇提物1.17 g/kg)和1:2(红参醇提物2.34 g/kg)给药组。将15只SD大鼠随机分成A、B、C3组, 每组5只, A组为附子醇提物单独给药组, B、C组分别为附子、红参醇提物配伍1:1和1:2给药组, 每天ig给药1次, 连续给药7d。

2.3 大鼠粪便样品的收集

ig 7d结束后, 收集各组大鼠的粪便, 放置于干燥的灭菌试管中, 于-80℃的冰箱保存。

2.4 DNA的提取及测序

将收集的各组大鼠粪便, 采用柱式粪便DNAout试剂盒进行DNA提取, 随后对粪便菌群的16Sr-RNA的V4区进行PCR扩增。

2.5 生物信息学分析

PCR产物在Illumina-Hi Seq平台上进行高通量测序。为了获得更高质量的DNA信息, 对高通量测序得到的初始数据进行质量质控和过滤。过程如下: (1)利用Uparse software(Uparse v7.0.1001, <http://drive5.com/uparse/>)对序列进行分析, 将相似性在97%以上的序列进行归并, 生成分类操作单元(OTU)。(2)菌群多样性分析: 利用QIIME(Version 1.7.0)软件计算样品的菌群丰度指数(Ace, Chao1)、菌群多样性指数(Simpson, Shannon)。

3 结果

3.1 菌群多样性分析

由图1可知, 随着测序数量的增加, A、B和C组的OTU数量也随着增大, 但增大的幅度呈递减的趋势, 说明测序质量较好, 具有一定的深度。在相同的条件下, A组和B组的OTU数量均高于C组, 说明A组和B组的菌群多样性要高于C组。

3组大鼠粪便细菌16S rRNA基因经PCR扩增后进行高通量测序, 菌群多样性统计结果见表1。A组

和B组的OTU分别为1 405和1 073,C组的OTU为902,A组和B组的OTU数量较C组显著增多($P < 0.05$),说明A组和B组的菌群多样性较高;3组的测序覆盖深度(Coverage指数)均在0.99以上,说明样品中序列未被检测到的可能性较低。A组和B组Ace、Chao1指数为1 393、1 368和1 085、1 057,C组Ace和Chao1指数为889和884,A组和B组较C组显著增多($P < 0.05, 0.01$),数据表明,A组和B组的菌群丰富性较C组高;Shannon值越大,表明群落多样性越高,3组的Simpson和Shannon指数无统计学差异。

3.2 微生物群落结构分析

在门(Phylum)的水平上,3组样品的微生物群落构成及其相对丰度如图2所示。所有样品均包含厚壁菌门 *Firmicutes* (A、B、C 3组样品分别占48.57%、48.11%、46.96%)、拟杆菌门 *Bacteroidetes* (A、B、C 3

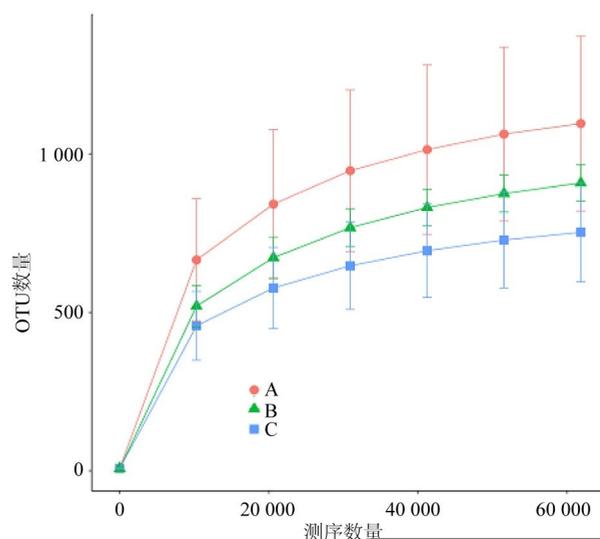


图1 3组样品的稀释曲线

Fig. 1 Rarefaction curve of three groups

表1 各组样品的Alpha多样性指数(±s, n=5)

Table 1 Alpha diversity index of the samples (±s, n=5)

组别	OTU	ACE	Chao1	Simpson	Shannon	Coverage
A	1 405±239*	1 393±235*	1 368±253*	0.966±0.009	6.966±0.596	0.997±0.000
B	1 073±29*	1 085±43**	1 057±33*	0.894±0.052	5.301±0.633	0.997±0.000
C	902±72	889±48	884±59	0.888±0.089	5.375±1.274	0.998±0.000

与C组比较:* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs C group

组样品分别占22.81%、21.68%、33.28%)和变形菌门 *Proteobacteria* (A、B、C 3组样品分别占23.50%、23.48%、17.11%)。

由图3可见,在属(Genus)的水平上,相对丰度较高的是乳酸杆菌属 *Lactobacillus* (A、B、C 3组样品分别占11.52%、9.65%、17.75%)、大肠埃希菌-志贺氏菌属 *Escherichia-Shigella* (A、B、C 3组样品分别占3.81%、14.38%、16.46%)、拟杆菌属 *Bacteroides* (A、B、C 3组样品分别占3.42%、5.15%、6.69%)等几个属,C组中乳酸杆菌属和拟杆菌属的含量较A组和B组增加。热图可以用颜色变化来反映二维矩阵或表格中的数据信息,可以直观地将数据值的大小以定义的颜色深浅表示出来,本研究将3组的35个菌属绘制成热图(图4)。

4 讨论

在正常情况下,肠道菌群在一定范围内处于动态平衡状态,肠道菌群的结构与宿主的健康和疾病密切相关。研究表明,药物可以改变肠道菌群的组成;同样,肠道菌群也可以影响口服药物的吸收和代谢处置。中药经口服抵达胃肠道后,不可避免会

与肠道菌群发生相互作用,其很多成分(如水溶性的苷类成分)都是借助肠道细菌的代谢作用转化后,才被吸收进入体内而发挥药理作用的。同时,中药中的某些成分(如苷类、糖类等)能起到益生元的作用,可直接促进益生菌的生长,且能够通过调节人体免疫功能而间接有利于肠道菌群的平衡。中药合理的配伍用药可通过促进肠道益生菌的生长,使处于紊乱状态的肠道菌群重新达到一个新的平衡状态,从而达到治疗某些疾病的目的。

本实验通过高通量测序技术研究附子、红参不同比例配伍对大鼠肠道菌群的影响,从调节肠道菌群的角度初步揭示二者配伍用药的作用机制。肠道微生物种类丰富,从门的水平上来说,拟杆菌门、厚壁菌门和变形菌门为优势菌门,约占肠道微生物的90%以上^[11-12]。本研究中,厚壁菌门、拟杆菌门和变形菌门均为3组样品中的优势菌门,这与相关文献报道一致。体外研究发现,红参对益生菌的生长具有一定的促进作用,且其对益生菌的促生长作用在一定范围内会随着浓度的逐渐增加而增大。本实验中,附子和红参1:2配伍给药时,乳酸杆菌属的含量

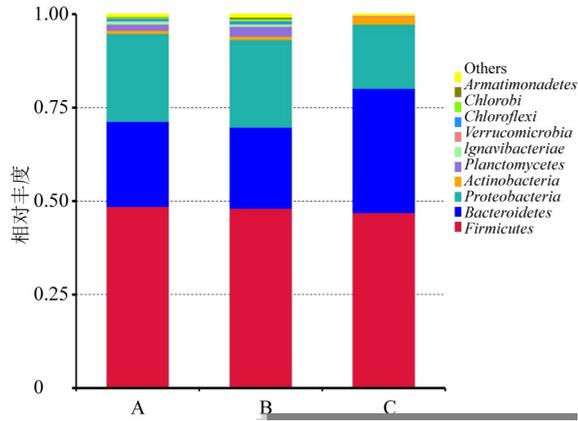


图2 3组大鼠粪便菌群在门水平上的分布

Fig. 2 Composition of 3 groups at the level of the phylum

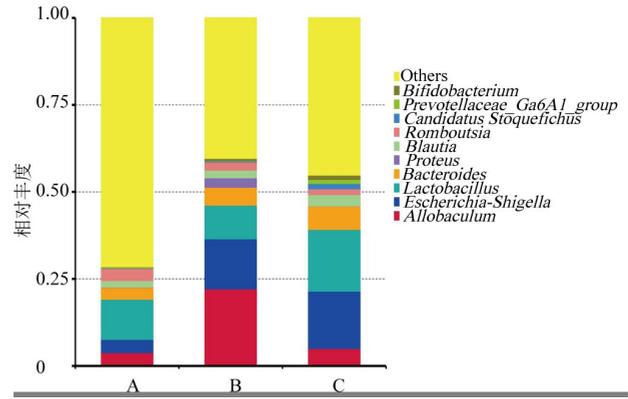


图3 3组大鼠粪便菌群在属水平上的分布

Fig. 3 Composition of 3 groups at the level of the genus

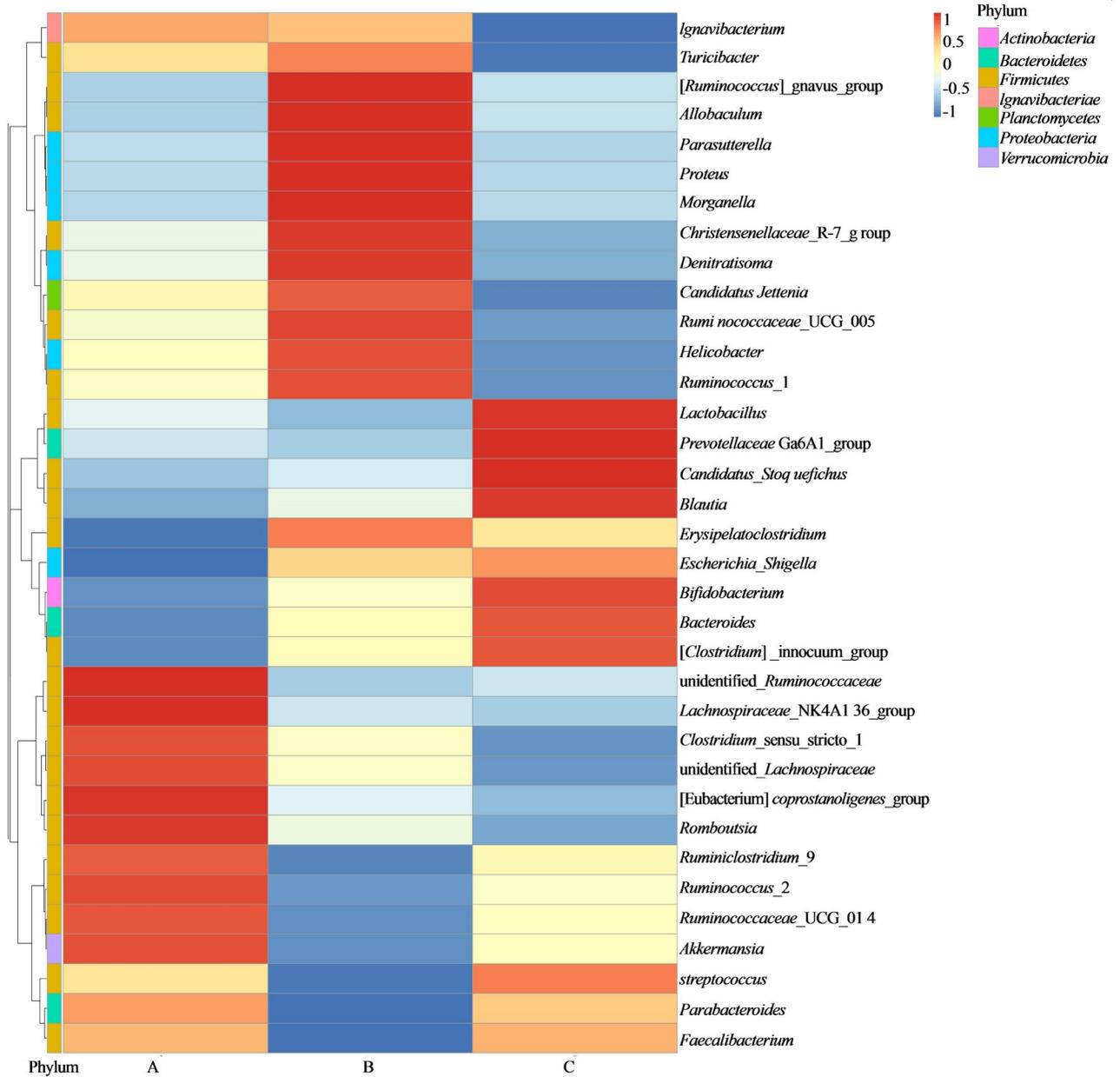


图4 3组大鼠粪便菌群在属水平上的heatmap聚类图

Fig. 4 Heatmap of three groups at the level of the genus

高于附子单独给药组和附子红参1:1配伍给药组。乳酸杆菌属是动物肠道菌群中的益生菌,说明随着红参配伍比例的增加,其在一定程度上可以改善肠道的微生态环境,为临床附子、红参配伍用药提供了理论依据。

参考文献

- [1] 徐 硕,梁晓丽,李 琼,等. 中药附子的研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2017, 32(2): 248-254.
- [2] 陈荣昌,孙桂波,张 强,等. 附子及其复方中药的药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(6): 883-888.
- [3] 贾雪岩,林 华,沈玉巧,等. 附子新型炮制品中乌头类生物碱测定及其强心作用研究 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(2): 224-229.
- [4] 何家乐. 参附配伍减毒的体内物质基础及作用机制研究 [D]. 安徽医科大学, 2015.
- [5] 徐菲飞. 参附注射液抗心力衰竭的机制研究 [D]. 成都中医药大学, 2013.
- [6] 郑 艺,张家超,郭 壮,等. 基于高通量测序技术分析肠道菌群及其影响因素的研究进展 [J]. 中国食品学报, 2014, 14(11): 157-164.
- [7] Wang Y, Shou J W, Jiang J D. Metabolism of Chinese Materia Medica in gut microbiota and its biological effects [J]. CHM, 2015, 7(2): 109-115.
- [8] Purchiaroni F, Tortora A, Gabrielli M, et al. The role of intestinal microbiota and the immune system [J]. Eur Rev Med Pharmac, 2013, 17(3): 323-333.
- [9] 汤 齐,高 霞,耿 婷,等. 肠道菌群与中药相互作用的研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(17): 3629-3635.
- [10] 曲 巍,张 智,马建章,等. 高通量测序研究益生菌对小鼠肠道菌群的影响 [J]. 食品科学, 2017, 38(1): 214-219.
- [11] 黄红丽,周永健,郑啼婴,等. 肠道菌群在非酒精性脂肪性肝病大鼠中的变化及意义 [J]. 广东医学, 2016, 37(9): 1283-1286.
- [12] 郭慧玲,邵玉宇,孟和毕力格,等. 肠道菌群与疾病关系的研究进展 [J]. 微生物学通报, 2015, 42(2): 400-410.
- [13] 张 娴,陈容平,陈 宏. 基于高通量测序技术分析肠道菌群与肥胖的研究进展 [J]. 医学综述, 2017, 23(23): 4577-4583.