

基于肠道菌群和代谢组学研究厚朴温中汤及其配方颗粒治疗脾胃虚寒型胃病的作用机制

欧阳莉¹, 余昭芬², 石宣宜¹, 施冲煜¹, 王青平¹, 张 涛¹, 刘建群^{1*}

1. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

2. 景德镇市第一人民医院 中药科, 江西 景德镇 333099

摘要: 目的 研究厚朴温中汤及其配方颗粒治疗脾胃虚寒型胃病的作用及机制。方法 采用猪油和冷食醋造模 10 d, 构建大鼠脾胃虚寒型胃病模型, 分别给予厚朴温中汤煎汤 (Houpo Wenzhong Decoction, DEC)、配方颗粒 (formula granules, GRA)、煎汤加辅料 (decoction with accessories, ACC) 治疗 7 d。ELISA 法检测大鼠血清胃动素 (motilin, MTL) 和胃泌素 (gastrin, GAS) 含量; 16S rRNA 高通量测序技术进行大鼠肠道菌群多样性分析, 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱 (ultra performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS/MS) 开展尿液和粪便的代谢组学研究, 并结合 Spearman 分析进行肠道菌群与代谢组学之间的关联分析。结果 与模型组比较, DEC 与 GRA 均可显著升高大鼠体质量、血清 MTL 及 GAS 含量 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。16S rRNA 测序结果显示, DEC 和 GRA 均可显著调控乳酸杆菌属、嗜木聚糖真杆菌属、毛螺菌科 NK4A136 群、罗氏菌属、未分类鼠杆菌科、活泼瘤胃球菌属、副沙门氏菌属的水平 ($P < 0.05$ 、 0.01)。尿液、粪便代谢组学各筛选出脾胃虚寒生物标志物 32、39 个, 其中在 DEC 组与 GRA 组中共同发现脾胃虚寒生物标志物 17 α ,21-二羟基孕烯醇酮、melibiitol、胆固醇乙酸酯、7 α -羟基-3-氧代-4-胆甾烯酸酯。代谢通路分析显示, DEC、GRA 通过调控尿液中的类固醇激素生物合成、苯丙氨酸代谢、维生素 B₆ 代谢等通路, 粪便中的类固醇生物合成、卟啉代谢等通路来发挥抗脾胃虚寒的作用。Spearman 分析发现部分肠道差异菌群与尿液、粪便中差异代谢物之间存在密切的关联性。结论 DEC、GRA 改善脾胃虚寒型胃病的作用机制可能与调控肠道菌群组成和类固醇合成、氨基酸代谢等相关通路有关, 且二者在生化指标、肠道菌群、代谢组学方面基本一致, 因此厚朴温中汤配方颗粒临床替用传统煎汤具有可行性。

关键词: 厚朴温中汤煎汤; 配方颗粒; 脾胃虚寒型胃病; 肠道菌群; 代谢组学; 17 α ,21-二羟基孕烯醇酮; melibiitol; 胆固醇乙酸酯; 7 α -羟基-3-氧代-4-胆甾烯酸酯

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)07-2412-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.07.017

Mechanism of Houpo Wenzhong Decoction and its formula granules in treatment of gastropathy with spleen and stomach deficiency cold type based on gut microbiota and metabolomics

OUYANG Li¹, YU Zhaofen², SHI Xuanyi¹, SHI Chongyu¹, WANG Qingping¹, ZHANG Tao¹, LIU Jianqun¹

1. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Department of Traditional Chinese medicine, Jingdezhen First People's Hospital, Jingdezhen 333099, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Houpo Wenzhong Decoction (厚朴温中汤) and its formula granules in treatment of gastropathy with spleen and stomach deficiency cold type, and provide a reference for evaluating the potential of formula granules as substitutes for traditional decoction. **Methods** Houpo Wenzhong Decoction (DEC), formula granules (GRA) and decoction with accessories (ACC) were used to treat the model rats of gastropathy with spleen and stomach deficiency cold type for 7 d, which was established by lard and cold vinegar for 10 d. The levels of motilin (MTL) and gastrin (GAS) in serum of rats were detected by ELISA.

收稿日期: 2024-11-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82160731); 江西中医药大学校级科技创新团队发展计划 (CXTD22007); 江西省科技创新基地 (20242BCC32062); 江西省研究生创新专项项目 (YC2024-B221)

作者简介: 欧阳莉, 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础及质量评价。E-mail: 1504941771@qq.com

*通信作者: 刘建群, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药药效物质基础及质量评价。E-mail: liu5308@sina.com

Gut microbiota diversity of rats was detected by 16S rRNA high-throughput sequencing technology, and then metabolomics in urine and feces were researched by ultra performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS). Finally, the correlation between gut microbiota and metabolomics was analyzed through Spearman's analysis. **Results** Compared with model group, the body weight ($P < 0.05$) and levels of MTL and GAS in serum ($P < 0.01, 0.001$) of rats were significantly increased both in DEC group and GRA group. The results of 16S rRNA sequencing indicated that *Lactobacillus*, *Eubacterium_xylanophilum_group*, *Lachnospiraceae_NK4A136_group*, *Roseburia*, *norank_f_Muribaculaceae*, *Ruminococcus_gnavus_group* and *Parasutterella* ($P < 0.05, 0.01$) were significantly regulated after treatment with DEC or GRA. A total of 32 biomarkers related to spleen and stomach deficiency cold were identified in urine, while 39 biomarkers were identified in feces. Notably, shared metabolites such as 17 α ,21-dihydroxypregnenolone, melibiitol, cholesterol acetate and 7 α -hydroxy-3-oxo-4-cholestenoate were found together in DEC and GRA groups. Metabolic pathway analysis indicated that DEC or GRA played an important role in regulating pathways such as steroid hormone biosynthesis, phenylalanine metabolism and vitamin B6 metabolism in urine, as well as steroid biosynthesis and porphyrin metabolism in feces. In addition, Spearman's correlation analysis also revealed that there was a strong correlation between some intestinal differential flora and differential metabolites in urine and feces. **Conclusion** The mechanism by which DEC and GRA improve gastropathy with spleen and stomach deficiency cold type may be related to the regulation of gut microbiota composition and pathways related to steroid synthesis and amino acid metabolism. Overall, DEC and GRA are basically the same in biochemical indexes, gut microbiota, and metabolomics. Thus, GRA may be suitable for clinical use as an alternative to traditional decoction.

Key words: Houpo Wenzhong Decoction; formula granules; gastropathy with spleen and stomach deficiency cold type; gut microbiota; metabolomics; 17 α ,21-dihydroxypregnenolone; melibiitol; cholesterol acetate; 7 α -hydroxy-3-oxo-4-cholestenoate

胃病是临床常见的消化系统难治性疾病,造成胃病的原因有很多,比如饮食因素、情绪影响、外部环境因素、身体虚弱脾胃素虚等,在胃病众多的分型中,以脾胃虚寒型较为多见^[1]。脾胃虚寒的主要症状为胃脘痛、脘腹胀,以及表现出喜温喜按、口淡不渴、四肢不温、大便稀溏、舌淡苔白、脉虚缓等,临床上多见于胃/十二指肠溃疡、慢性胃炎、功能性消化不良等^[2]。随着社会快速发展,人们生活方式以及饮食结构发生较大变化,脾胃虚寒型胃病的发病率呈现急速增长趋势,可见其危害严重,需引起重视^[3]。

西医治疗该病症主要给予质子泵抑制剂、胃黏膜保护剂、促胃肠动力药等,但易产生不良反应、耐药性及复发率高等问题,中医药是我国医疗保健的重要组成部分,具有疗效显著、不良反应少等优势,已被用于治疗各种疾病,在脾胃虚寒型胃病的治疗中也取得了一些成效^[4]。经典名方是我国历代医家临床经验的结晶,随着国家药品监督管理局正式批准了首个遵循古代经典名方目录管理的中药复方制剂苓桂术甘颗粒上市,推进了古代经典名方向新药转化的生动实践,为中医药创新提供了更多新机遇^[5]。厚朴温中汤出自金代李东垣的《内外伤辨惑论》^[6],并收录于 2018 年国家中医药管理局颁布的《古代经典名方目录(第一批)》,该方由姜厚朴、陈皮(去白)、炒甘草、草豆蔻、茯苓、木香、干姜 7 味药组成,主治脾胃虚寒、脘腹胀满或疼痛

等,其加减治疗脾胃虚寒型胃病已经被众多临床试验所验证^[7]。中药传统汤剂历经数千年的沉淀与发展,但因煎煮耗时耗力、不易携带保存的特点,使其在现代临床使用中受到限制。配方颗粒是国家中医药管理局组织开展的中药剂型改革的科研成果,既保留了传统中医药辨证论治、复方配伍、随症加减的特色,还具备现代制剂“三效”“三小”“五方便”的特点,在临床上得到了广泛应用。随着在实际诊疗中的应用愈加广泛,中药配方颗粒在中医药领域所占比重日益增加,截至目前,国家药典委员会已经颁布 7 批共 324 个中药配方颗粒国家标准,为中药配方颗粒全面放开奠定了基础。随着中药配方颗粒的不断发展,配方颗粒与传统汤剂之间的等效性及一致性研究也显得愈发重要。课题组前期对厚朴温中汤合煎汤剂与单煎配方颗粒的一致性研究主要有化学成分、入血成分、药效等,研究发现二者的差异性化学成分在入血后差异减小,胃肠激素水平、药效等无显著性差异^[8-9],但是仅从单一层面阐释中药复方治疗脾胃虚寒型胃病的作用机制往往存在局限性,有可能无法全面反映药物在生物体内的复杂作用机制。

肠道菌群是定植于人体肠道的正常微生物,与机体具有共生关系,种类丰富、数量多,许多疾病如胃病、炎症性肠病、代谢综合征、肝硬化等的发生发展都是因为肠道微生态的平衡遭到了破坏^[10]。肠道菌群在肠道内的功能与中医理论中的脾胃功

能具有一定的相似性,传统中药多为口服给药,而这些中草药成分在摄入后通常不会直接被宿主吸收,而是会进入肠道,经由肠道菌群的代谢转化,因此,中药与肠道菌群的相互作用被视为中药药效机制研究的新领域^[1]。代谢组学通过检测生物体内源性代谢物的水平,为疾病的诊断提供独特的视角,这种方法在分析生物体代谢状况的动态变化时,具有整体性和系统性的特点,这与中医“整体观”相吻合,也符合中医药多靶点、多途径的治疗特色,近年来在中药复方作用机制的研究中应用较广泛^[12]。肠道菌群与代谢组学结合有利于全面认识疾病,筛选出对疾病有意义的代谢产物,探究微生物与疾病的因果关系。据此,本研究以相同批次的中药饮片制备厚朴温中汤及其配方颗粒,联合肠道菌群和代谢组学探讨厚朴温中汤煎汤及其配方颗粒治疗脾胃虚寒型胃病的作用机制,并评价二者治疗脾胃虚寒型胃病的一致性和等效性,提供单味药配方颗粒临床替用传统汤剂的可行性参考。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只,体质量 170~190 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号 SCXK(湘)2019-0004。动物适应性饲养 7 d 后开始实验,温度 23~26 °C,相对湿度 50%~70%。本研究所涉及的动物实验经江西中医药大学动物伦理委员会批准(批准号 JZLLSC20220815)。

1.2 药材

厚朴(批号 2021092610)购自江西沐康中药饮片公司;干姜(批号 2022061701)、茯苓(批号 2022032401)购自江西江中中药饮片有限公司,陈皮(批号 2019112711)、甘草(批号 2022013301)、草豆蔻(批号 2022012301)、木香(批号 2022010801)分别于江西赣州、新疆和田、海南五指山、云南玉龙当地采集;以上各药材经江西中医药大学中药鉴定室付小梅教授鉴定分别为木兰科植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. 的干燥干皮、根皮及枝皮、芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 的干燥成熟果皮、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎、姜科植物草豆蔻 *Alpinia katsumadai* Hayata 的干燥近成熟种子、多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核、菊科植物木香 *Aucklandia lappa* Decne. 的干燥根、姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的干燥根茎,均符

合《中国药典》2020 年版规定。厚朴炮制方法参照《中国药典》2020 年版姜汁炙法(通则 0213),陈皮去白方法参照《中国药典》2020 年版净制法刮去白色部分,甘草炮制方法参照《中国药典》2020 年版清炒方法(通则 0123)以及《浙江省中药饮片炮制规范(2015 版)》炒甘草方法。

1.3 试剂

5%食醋(批号 20231101)购自山西紫林醋业股份有限公司;精制猪油(批号 20231115)购自临沂新程金锣肉制品集团有限公司;胃动素(motilin, MTL)试剂盒(批号 20231221)、胃泌素(gastrin, GAS)试剂盒(批号 20231221)均购自南京建成生物工程研究所;对照品厚朴酚(批号 110729-202316,质量分数 99.2%)、和厚朴酚(批号 110730-202416,质量分数 99.8%)、山姜素(批号 110762-202407,质量分数 99.4%)、橙皮苷(批号 110721-202220,质量分数 97.2%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈(质谱级,批号 C15974971)、甲酸(质谱级,批号 C16687187)购自上海麦克林生化科技股份有限公司;甲醇(质谱级,批号 L1207235214)购自德国默克公司。

1.4 仪器

Triple TOF 5600⁺型高分辨质谱仪(美国 AB SCIEX 公司);LC-30A 型超高效液相色谱仪(日本岛津公司);Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);Milli-Q 型纯水仪(美国 Millipore 公司);SPARK 10M 型多功能酶标仪(瑞士 TECAN 公司);Geno/Grinder 型高通量冷冻组织研磨仪(美国 Spex SamplePrep 公司);EYELA N-1300 型旋转蒸发仪(日本东京理化器械株式会社);MTN-2800D 型氮吹浓缩装置(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);TGL-16.5M 型高速离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司);GeneAmp[®] 9700 型 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司);Illumina MiSeq 型测序仪(美国 Illumina 公司);Nano Drop-2000 型超微量分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

2 方法

2.1 药液的制备和质量控制

2.1.1 厚朴温中汤煎汤的制备 按照本课题组前期研究方法^[13],取厚朴(姜制)37.30 g、陈皮(去白)37.30 g、甘草(炒制)18.65 g、草豆蔻 18.65 g、茯苓(茯苓块)18.65 g、木香 18.65 g、干姜 3.069 g,打粗粉后按比例混合均匀,称取 10 g,加水 400 mL,

煮至 200 mL, 去渣, 趁热滤过, 浓缩至生药质量浓度为 1.5 g/mL, 即得。

2.1.2 厚朴温中汤配方颗粒的制备 按照原方的配伍比例精密称取课题组自制的各药材配方颗粒进行组方, 模拟配方颗粒冲服方式, 加温水溶解成与“2.1.1”项下相同的生药质量浓度, 即得。

2.1.3 煎汤加辅料药液的制备 向厚朴温中汤煎汤中加入辅料适量(称取的各药材配方颗粒量中所含辅料的量), 即得。

2.1.4 厚朴温中汤煎汤及组方中配方颗粒的质量控制 以厚朴酚、和厚朴酚、橙皮苷、山姜素为对照品, 采用 HPLC 法^[14]测定厚朴温中汤煎汤中 4 个指标性成分的含量。组方中各单味药配方颗粒与煎汤药材为同一批次, 颗粒均为自制, 根据配方颗粒国家标准或地方标准对相应配方颗粒进行含量测定。

2.2 脾胃虚寒型胃病大鼠模型的制备

根据文献方法^[9]复制脾胃虚寒型胃病大鼠模型。每天上午 ig 4 °C 冷食醋(10 mL/kg), 下午 ig 精炼猪油(10 mL/kg), 持续造模 10 d。10 d 后观察到大鼠出现进食饮水减少、体温偏低、舌苔发紫、倦卧少动、大便稀溏、腹部胀气、体质量骤减等现象, 并结合大鼠血清中 MTL 及 GAS 含量下降, 提示造模成功^[13]。

2.3 动物分组及给药

取 6 只大鼠作为对照组, 每天上午、下午 ig 蒸馏水(10 mL/kg), 将造模成功的大鼠随机分为模型组、厚朴温中汤煎汤(Houpo Wenzhong Decoction, DEC)组、配方颗粒(formula granules, GRA)组及煎汤加辅料(decoction with accessories, ACC)组, 每组 6 只。DEC 组、GRA 组及 ACC 组均 ig 相应药液 13.5 g/kg(以生药量计), 对照组和模型组 ig 等体积的蒸馏水, 1 次/d, 连续 7 d。

2.4 样本的采集及处理

末次给药 12 h 后, 将大鼠置于代谢笼内, 禁食不禁水, 收集 12~24 h 的尿液和粪便, 样本置于-80 °C 保存; 将收集的尿液各取 500 μ L 合并于干燥离心管内, 涡旋混匀, 标记为质控(quality control, QC)样品, 另外, 所有样品各取 500 μ L, 分别置于干燥的离心管中, 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min 后, 加入甲醇 3 mL, 涡旋 1 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 取全部上清液, 氮气吹干后加入甲醇 200 μ L 复溶, 涡旋 3 min 后, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 等待进样分析; 将收集的粪便

各取 100 mg, 加入适量甲醇, 匀浆混合后, 超声提取 30 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 置氮吹仪上于 37 °C 浓缩至干, 样品加入 200 μ L 甲醇复溶, 涡旋混匀, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min 后取上清待测, 另外, 每个样品中分别吸取 10 μ L, 混合后作为 QC 样品; 尿液和粪便样品均用于非靶向代谢组检测。然后, 各组大鼠 ip 1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉, 腹主动脉采血, 室温静置 1 h 后, 3 500 r/min 离心 15 min, 分离血清用于 MTL、GAS 的检测。最后收集各组大鼠盲肠内容物, 液氮速冻后置于-80 °C 保存, 干冰填埋转运至上海美吉生物医药科技有限公司进行 16S rRNA 测序。

2.5 相关指标的测定

实验期间记录大鼠体质量和摄食量, 实验结束后, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测大鼠血清中 MTL 和 GAS 的含量。

2.6 16S rRNA 高通量测序

大鼠盲肠内容物样品的肠道菌群多样性测序由上海美吉生物医药科技有限公司完成, 采用基因组 DNA 抽提试剂盒进行总 DNA 抽提, 对 16S rRNA 基因的 V3~V4 区进行 PCR 扩增, 将得到的 PCR 扩增产物进行纯化、定量和均一化后形成测序文库, 并进行质检, 经检测合格的文库在 Illumina MiSeq PE300 平台上进行高通量测序。检测各组大鼠肠道菌群变化情况。

2.7 非靶向代谢组学分析

2.7.1 色谱条件 采用 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μ m), 流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈溶液(B), 梯度洗脱: 0.01~15 min, 5%~60% B; 15~25 min, 60%~100% B; 25~27 min, 100% B; 27~27.1 min, 100%~5% B; 27.1~30 min, 5% B; 体积流量 0.25 mL/min; 进样体积: 尿液 3 μ L, 粪便 1 μ L; 柱温 30 °C。

2.7.2 质谱条件 采用正离子扫描模式, 温度 500 °C, 离子源电压 5.5 kV, 裂解电压 100 V, 去簇电压 100 V, 碰撞能量 35 eV, 以氮气为雾化气体, 温度 500 °C, 数据采集范围 m/z 50~1 500, 气帘气 40 psi(1 psi=6.895 kPa), 数据采集时间 30 min, 喷雾气和辅助气均为 50 psi。使用 QC 样品进行方法学验证, 在信号数据采集起始、结束阶段, 以及分析过程中每 8 针样品后穿插 1 针 QC 样品, 以此监测并记录整个过程中信号的漂移状况。

2.7.3 数据处理 对各组大鼠尿液、粪便样本进行

检测, 将 UPLC-Q-TOF-MS 分析所得数据导入 MarkerView 1.2.1 软件进行预处理, 包括峰对齐、峰匹配等步骤, 得到包含化合物保留时间和质荷比信息的文本文件。采用 SIMCA-P 14.1 软件对处理后的数据进行多元统计分析, 具体方法包括主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)。利用多元 OPLS-DA 模型的变量重要性投影 (variable importance in projection, VIP) 值大于 1.0、组间变化倍数 (fold change, FC) <0.8 或 >1.2 且 $P < 0.05$ 筛选差异性代谢物。使用人类代谢组数据库 (human metabolome database, HMDB)、京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 等确定代谢物结构, 并筛选出各组潜在的生物标志物。最后, 将各组筛选得到的差异性标志物分别导入 MetaboAnalyst 6.0, 并借助 KEGG 数据库对鉴定出的生物标志物进行代谢通路的归属。

2.8 Spearman 关联分析

利用 Spearman 相关性分析方法, 对给药后大鼠肠道菌群中差异显著的菌属和代谢组学中差异显著的生物标志物进行关联性研究, 研究肠道菌群分布与内源性代谢物之间是否有依存关系, 以揭示肠道菌群与代谢物之间的相互作用关系^[15]。

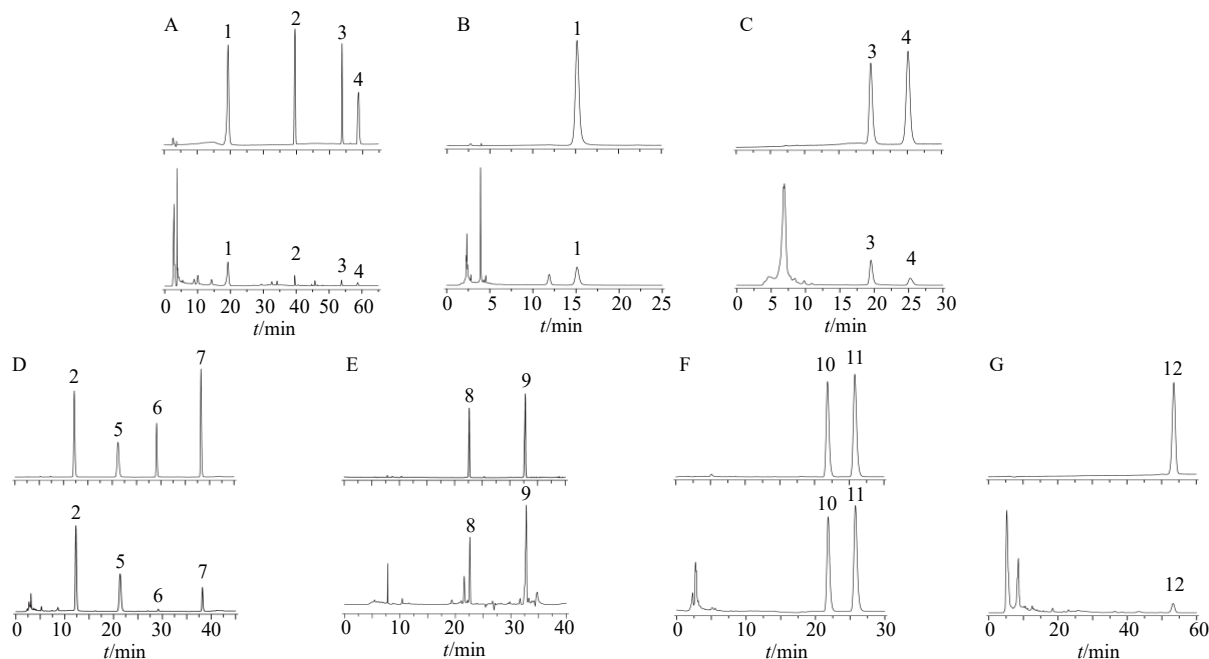
2.9 统计学分析

使用 GraphPad Prism 9.0 软件对数据进行统计学分析, 正态分布的定量数据在两组间比较采用 t 检验, 多组间数据比较则需采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。非正态分布的定量数据采用秩和检验, 肠道菌群数据采用上海美吉医药科技有限公司生物云平台进行统计分析。

3 结果

3.1 厚朴温中汤煎汤和组方中各单味药配方颗粒的成分分析

对照品和供试品的液相色谱图见图 1-A~G。测得厚朴温中汤煎汤中, 含厚朴酚和厚朴酚的总



1-橙皮苷; 2-山姜素; 3-和厚朴酚; 4-厚朴酚; 5-乔松素; 6-小豆蔻明; 7-桉木酮; 8-甘草苷; 9-甘草酸铵; 10-木香炔内酯; 11-去氢木香内酯; 12-6-姜辣素。

1-hesperidin; 2-alpinetin; 3-honokiol; 4-magnolol; 5-pinocembrin; 6-cardamonin; 7-alnustone; 8-liquiritin; 9-ammonium glycyrrhizinate; 10-costunolide; 11-dehydrocostuslactone; 12-6-gingerol.

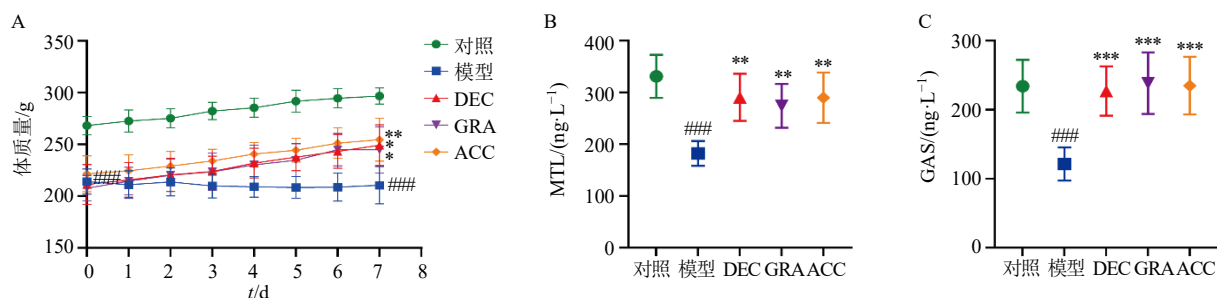
图 1 厚朴温中汤煎汤 (A)、陈皮 (去白) 配方颗粒 (B)、姜厚朴配方颗粒 (C)、草豆蔻配方颗粒 (D)、炒甘草配方颗粒 (E)、木香配方颗粒 (F)、干姜配方颗粒 (G) 的对照品和供试品的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of standard solution and test solution of Houpo Wenzhong Decoction (A), *Citri Reticulatae Pericarpium* (remove white inner capsule) formula granules (B), ginger juice-processed *Magnoliae Officinalis Cortex* formula granules (C), *Alpiniae Katsumadai Semen* formula granules (D), fried *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* formula granules (E), *Aucklandiae Radix* formula granules (F), *Zingiberis Rhizoma* formula granules (G)

质量分数为 0.09%、橙皮苷的质量分数为 0.45%、山姜素的质量分数为 0.03%；姜厚朴配方颗粒中厚朴酚和和厚朴酚的总质量分数为 3.10%，草豆蔻配方颗粒中山姜素、乔松素、小豆蔻明的总质量分数为 3.13%、桉木酮的质量分数为 0.16%，陈皮（去白）配方颗粒中橙皮苷的质量分数为 0.64%，木香配方颗粒中木香炔内酯和去氢木香内酯的总含量质量分数为 2.48%，炒甘草配方颗粒中甘草苷的质量分数为 0.51%、甘草酸铵的质量分数为 2.49%，干姜配方颗粒中 6-姜辣素的质量分数为 0.53%。

3.2 对大鼠体质量、血清 MTL 和 GAS 水平的影响

如图 2-A 所示，给药前，模型组大鼠体质量均显著低于对照组 ($P < 0.001$)；造模成功的大鼠连续给药 7 d 后，DEC 组及 GRA 组大鼠体质量均显著高于模型组 ($P < 0.05$)，且二者无显著性差异。如图 2-B、C 所示，与对照组比较，模型组血清中 MTL 和 GAS 水平显著降低 ($P < 0.001$)；与模型组比较，各给药组 MTL 和 GAS 水平均显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)；各给药组间 MTL 和 GAS 水平无显著差异。以上结果表明，脾胃虚寒型胃病大鼠模型制备成功，厚朴温中汤煎汤及其配方颗粒疗效良好且无显著性差异。



A-给药期间各组大鼠体质量；B-MTL 水平；C-GAS 水平；与对照组比较：### $P < 0.001$ ；与模型组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ ，下同。

A-body weight of rats in each group during administration; B-MTL level; C-GAS level; ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

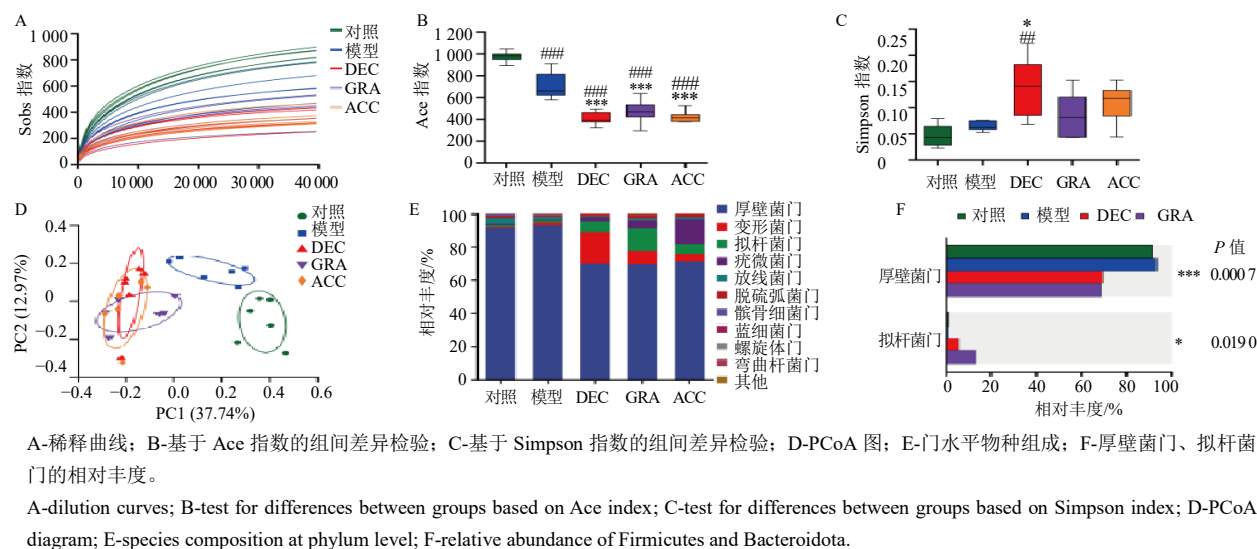
图 2 给药期间各组大鼠体质量、MTL 和 GAS 水平变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 2 Changes of body weight of rats in each group during administration and MTL and GAS level ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3.3 对肠道菌群的影响

如图 3-A 所示，随着样本数的增多，稀释曲线逐渐趋于平缓，更多的数据量只会产生少量新的物种，表明本研究对大鼠盲肠内容物的基因测序深度完全满足后续分析的要求。如图 3-B、C 所示，与对照组比较，模型组的 Ace 指数显著降低 ($P < 0.001$)，而 Simpson 指数升高，但差异不显著，各给药组的 Ace 指数均显著低于模型组 ($P < 0.001$)，DEC 组的 Simpson 指数较模型组显著上升 ($P < 0.05$)，各给药组之间的 Ace 指数和 Simpson 指数均无显著变化，提示药物可以改变大鼠肠道菌群的均匀度和多样性。本研究各组间属水平的主坐标分析 (principal co-ordinates analysis, PCoA) 结果显示，模型组远离对照组，3 个给药组远离模型组并且有靠近对照组的趋势，3 个给药组样本点交叉聚集在一起，结果见图 3-D。以上结果表明，厚朴温中汤煎汤及其配方颗粒菌群组成相似，且干预后可以恢复模型大鼠的菌群结构。

进行肠道差异菌群分析，如图 3-E、F 所示，在门分类水平上，厚壁菌门、变形菌门以及拟杆菌门构成了 5 组大鼠肠道菌群的核心菌门，然而它们在各组中的具体构成存在差异，与模型组比较，DEC 组和 GRA 组的厚壁菌门 / 拟杆菌门 (Firmicutes/Bacteroidetes, F/B) 的值均有所下降。如图 4-A~C 所示，在属分类水平上，与对照组比较，模型组的乳酸杆菌属、经黏液真杆菌属、毛螺菌科 NK4A136 群、嗜木聚糖真杆菌属、罗氏菌属、扭链瘤胃球菌属、单球菌属的相对丰度升高，阿克曼氏菌属、未分类鼠杆菌科、活泼瘤胃球菌属、副沙门氏菌属相对丰度降低；给予 DEC 和 GRA 均可显著性回调乳酸杆菌属、嗜木聚糖真杆菌属、毛螺菌科 NK4A136 群、罗氏菌属、未分类鼠杆菌科、活泼瘤胃球菌属、副沙门氏菌属至正常水平 ($P < 0.05$ 、 0.01)，其中，DEC 对于嗜木聚糖真杆菌属、罗氏菌属、毛螺菌科 NK4A136 群、活泼瘤胃球菌属的回调能力更强，GRA 对于乳酸杆菌属、未分类鼠杆菌科、

图 3 各组大鼠肠道菌群多样性分析 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 3 Analysis diversity of gut microbiota of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

副沙门氏菌属的回调能力更强, DEC 还可下调扭链瘤胃球菌群、单球菌属的水平, GRA 还可上调阿克曼氏菌属的水平。

各组大鼠肠道菌群 LEfSe 分析如图 4-D、E 所示, 设置 LDA 值 >4 , 根据 LEfSe 差异物种注释分支例图和差异物种分数图综合分析从门到属每组中有特征性差异的菌群, DEC 组从门水平调控变形菌门, 科水平调控肠杆菌科、毛螺菌科, 属水平调控活泼瘤胃球菌群、埃希氏菌-志贺氏菌属; GRA 组从门水平调控拟杆菌门, 科水平调控鼠杆菌科, 属水平调控经黏液真杆菌属、未分类鼠杆菌科, 提示这些物种的丰度改变可能与厚朴温中汤煎汤及其配方颗粒对肠道环境的影响有关。

3.4 各组大鼠代谢组学分析

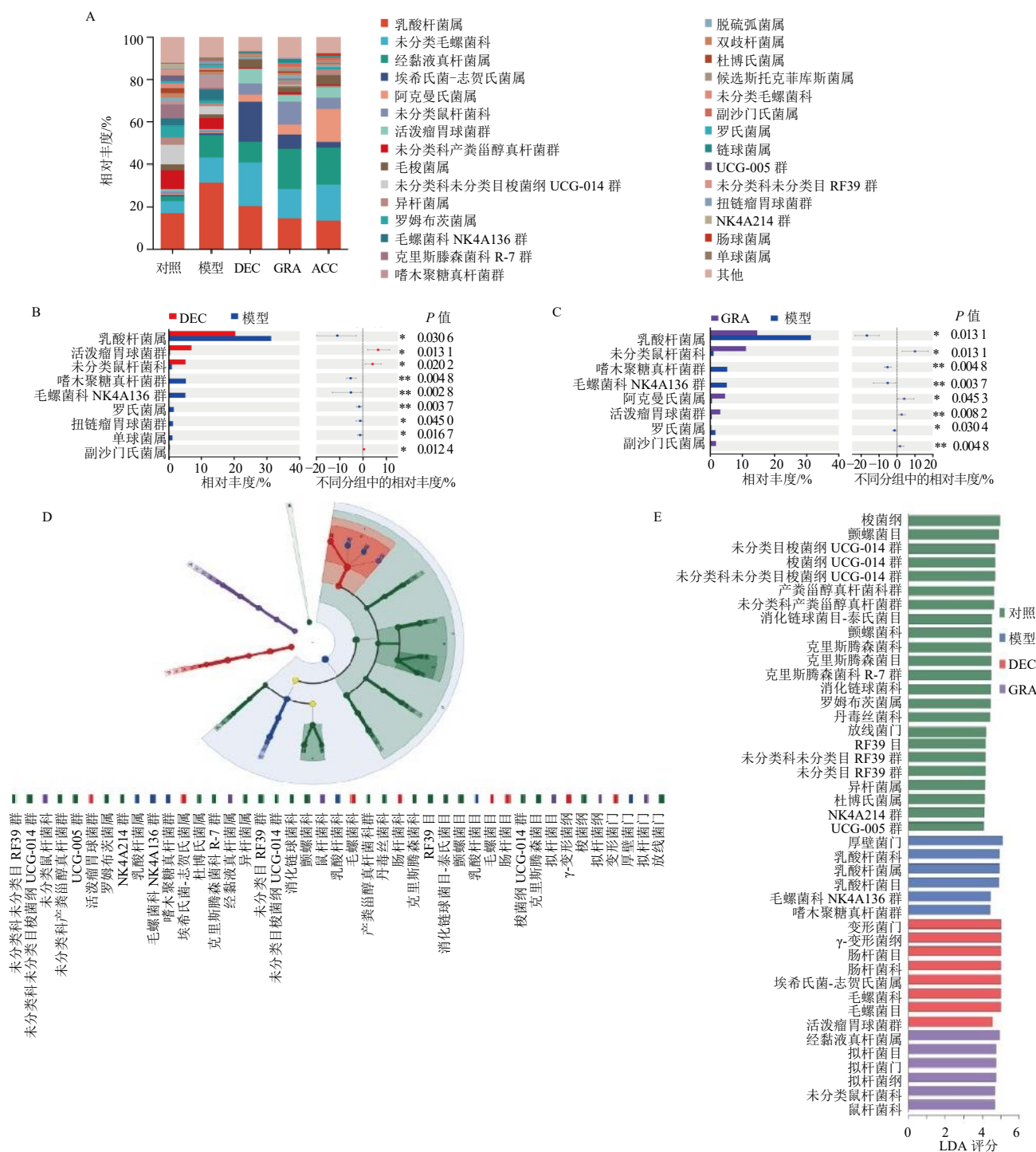
3.4.1 代谢轮廓分析 如图 5-A、B 所示, 分别对尿液和粪便的 QC 样本进行 Pearson 相关性分析, QC 样本间相关系数均在 0.9 以上, 表明此分析方法具有良好的重现性和稳定性。本研究大鼠尿液、粪便样本在正离子模式下的代谢物 PCA 结果可以看出, 各给药组样本之间存在一定的交叉, 对照组与模型组样本较明显分离, 各给药组趋近对照组并远离模型组, 且各组内样本无明显离散点, 组内平行性好, 见图 5-C、D; DEC 组与 GRA 组尿液、粪便中的内源性成分均存在一定交叉, 见图 5-E、F。以上结果表明, 脾胃虚寒型胃病大鼠尿液、粪便中的内源性代谢物均发生了明显的变化, 药物干预之后可趋于正常水平, 厚朴温中汤煎汤及其配方颗粒组

的内源性代谢物较为相似。

3.4.2 生物标志物的鉴定

(1) OPLS-DA: 采用 PCA 滤过异常值, 然后通过 OPLS-DA, 同时, 为了避免模型过度拟合, 进行 200 次置换检验, R^2 数值越接近 1, 表明模型稳定性越强, Q^2 表明该建模的预测指数, 其中, Q^2 的回归线截距为负, 说明模型不存在过度拟合现象并具有良好的稳定性, 具有良好的预测分析能力。OPLS-DA 结果显示, 对照组和模型组、DEC 组与模型组、GRA 组与模型组分离明显, 显示了良好的模型适应性, 见图 6-A~F。

(2) 代谢物的鉴定: 基于 OPLS-DA 模型, 以 $VIP > 1.0$ 、 $FC < 0.8$ 或 > 1.2 且 $P < 0.05$ 为条件筛选尿液和粪便样本的组间差异代谢物, 并绘制火山图, 见图 7-A、B。结合数据库等对代谢物进行鉴定, 在尿液、粪便样本中各筛选出 32、39 个差异代谢物, 在 DEC 组与模型组中分别筛选出 11、6 个差异代谢物, 在 GRA 组与模型组中分别筛选出 9、5 个差异代谢物。为了直观比较各组生物标志物的含量变化, 将含量数据转化为易于观察的热图形式, 颜色深浅反映变量值, 红色表示该物质在该组的相对含量上调, 蓝色代表下调, 如图 7-C 所示, 尿液样本中, 与对照组比较, 模型组上调苯乙酰甘氨酸、泛酸等 20 个差异代谢物, 给予 DEC 和 GRA 均可回调差异代谢物 17 α ,21-二羟基孕烯醇酮和 melibiitol 的水平, 其中 DEC 组还可回调苯乙酰甘氨酸和 L-甲氧基去甲肾上腺素的水平; 通过对比分析发现,



A-属水平物种组成; B-属水平 DEC 组与模型组样本菌群差异; C-属水平 GRA 组与模型组样本菌群差异; D-LEfSe 差异物种注释分支图; E-差异物种分数图。

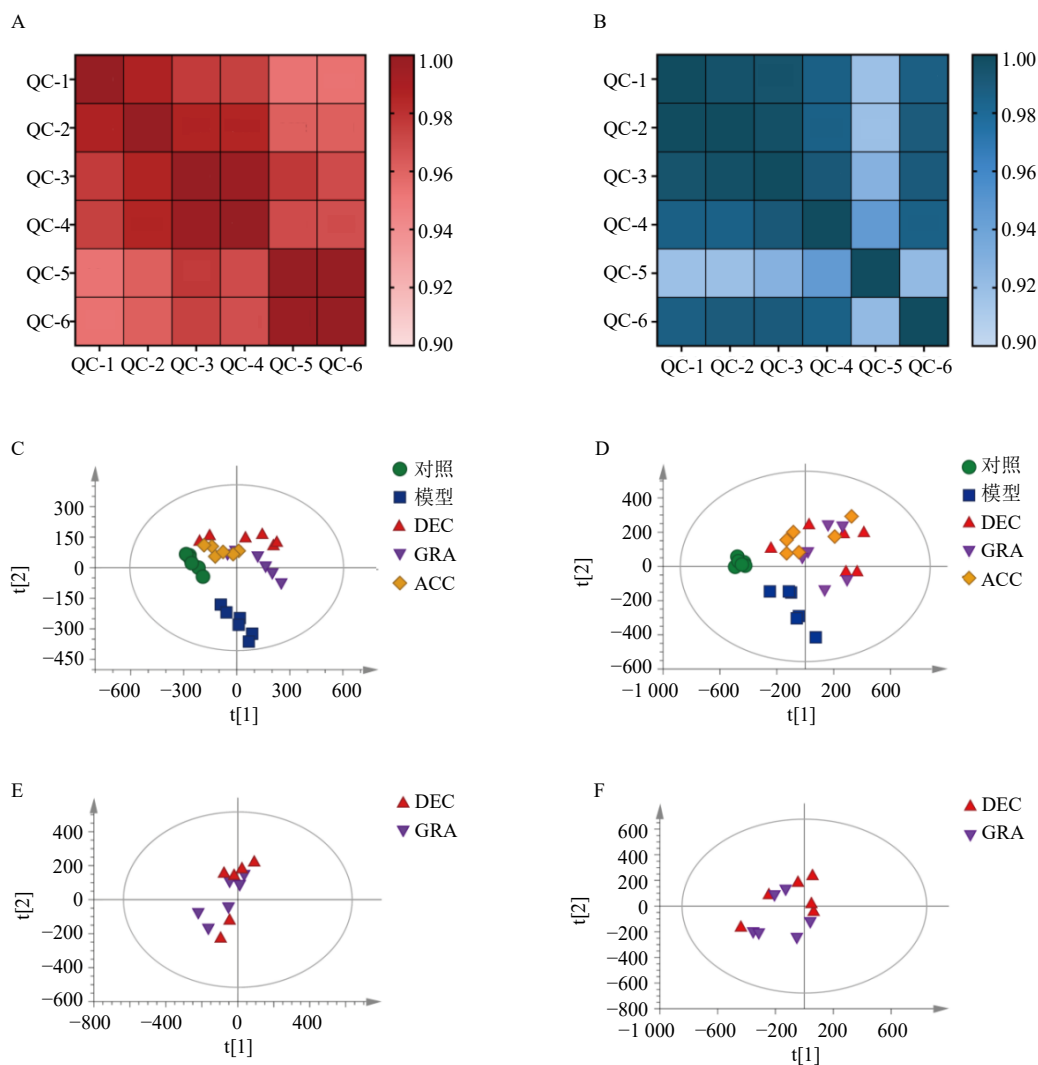
A-species composition at genus level; B-microbiota differences between DEC group and model group at genus level; C-microbiota differences between GRA group and model group at genus level; D-LEfSe differential species annotation branch example diagram; E-differential species score diagram.

图 4 各组大鼠肠道菌群差异性分析 ($n = 6$)

Fig. 4 Analysis difference of gut microbiota of rats in each group ($n = 6$)

melibiitol 在 DEC 组中更向对照组回调, 17 α ,21-二羟基孕烯醇酮在 GRA 组中更向对照组回调。如图 7-D 所示, 粪便样本中, 与对照组比较, 模型组

上调胆酸、原卟啉 IX 等 15 个差异代谢物, 下调 δ 8,14-甾醇、亚油酸等 20 个差异代谢物, 给予 DEC 后可下调原卟啉 IX、7 α -羟基-3-氧代-4-胆甾烯酸酯



A-尿液的 QC 样本相关系数矩阵热图; B-粪便的 QC 样本相关系数矩阵热图; C-各组大鼠尿液 PCA 散点图; D-各组大鼠粪便 PCA 散点图; E-DEC 组和 GRA 组的尿液 PCA 散点图; F-DEC 组和 GRA 组的粪便 PCA 散点图。

A-heat map of correlation coefficient matrix of QC in urine; B-heat map of correlation coefficient matrix of QC in feces; C-PCA scatter plots of samples in urine of rats in each group; D-PCA scatter plots of samples in feces of rats in each group; E-PCA scatter plots of samples in urine in DEC group and GRA group; F-PCA scatter plots of samples in feces in DEC group and GRA group.

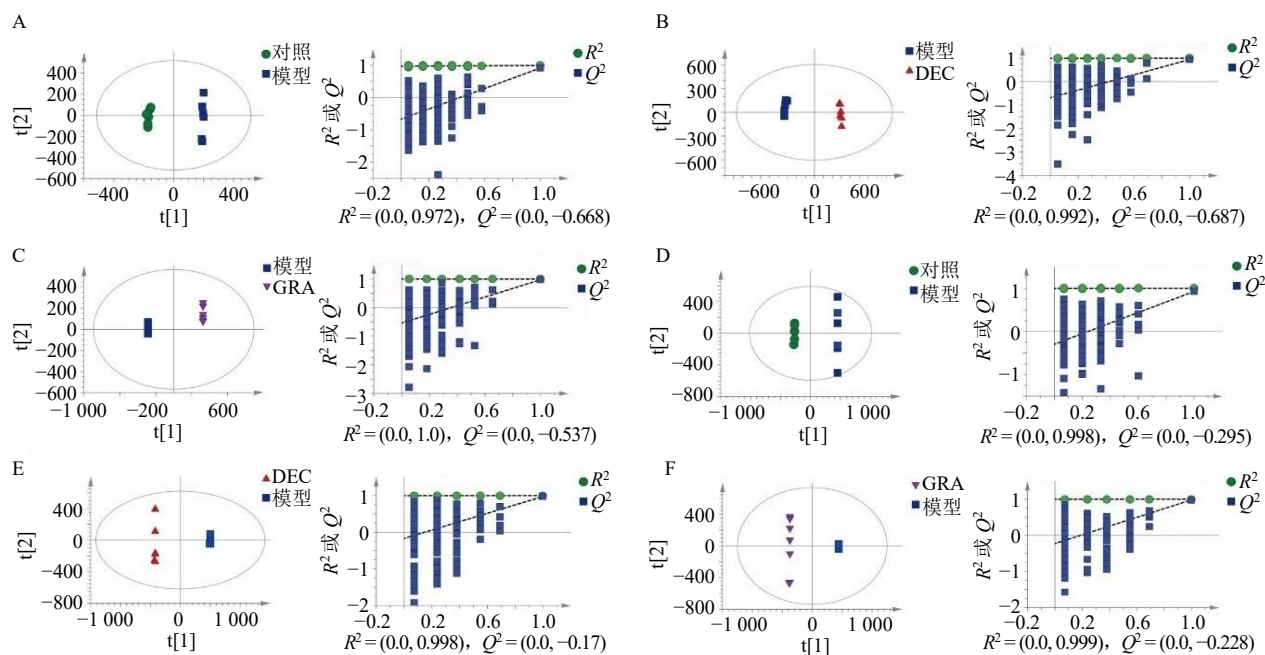
图 5 QC 样本 Pearson 相关系数矩阵热图以及各组大鼠尿液、粪便代谢物的 PCA ($n = 6$)

Fig. 5 Heat map of Pearson's correlation coefficient matrix of QC and PCA of metabolites in urine and feces of rats in each group ($n = 6$)

的水平,上调胆固醇乙酸酯、4,4-二甲基-5 α -胆甾-8,24-二烯-3 β -醇的水平,给予 GRA 可上调胆固醇乙酸酯的水平、下调 7 α -羟基-3-氧代-4-胆甾烯酸酯的水平;通过对比分析发现,GRA 组中的 2 个抗脾胃虚寒证生物标志物与 DEC 组高度重合,其中胆固醇乙酸酯、7 α -羟基-3-氧代-4-胆甾烯酸酯在 DEC 组中均更向对照组回调。

3.4.3 代谢通路分析 将筛选得到的各组间尿液和粪便差异代谢物分别导入 MetaboAnalyst 6.0 数据处理平台进行通路富集分析,如图 8-A、B 所示,

造模后,尿液中的类固醇激素生物合成、生物素代谢、色氨酸代谢等通路紊乱,粪便中类固醇生物合成、初级胆汁酸的生物合成、亚油酸代谢等通路紊乱;给予 DEC 治疗后,可以改善尿液中苯丙氨酸代谢、类固醇激素生物合成、半乳糖代谢等,其中苯丙氨酸代谢通路具有显著影响性,粪便中类固醇生物合成和卟啉代谢通路具有显著影响性;给予 GRA 治疗后,尿液中涉及的代谢通路有戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化、维生素 B₆ 代谢和半乳糖代谢等,其中维生素 B₆ 代谢和苯丙氨酸代谢通路的 $-\lg P$ 值较



A-对照组和模型组的尿液; B-DEC 组和模型组的尿液; C-GRA 组和模型组的尿液; D-对照组和模型组的粪便; E-DEC 组和模型组的粪便; F-GRA 组和模型组的粪便。

A-urine in control group and model group; B-urine in DEC group and model group; C-urine in GRA group and model group; D-feces in control group and model group; E-feces in DEC group and model group; F-feces in GRA group and model group.

图 6 各组大鼠的 OPLS-DA 及相应模型验证图 ($n=6$)

Fig. 6 OPLS-DA score plots and corresponding model validation plot of samples in urine and feces of rats in each group ($n=6$)

大, 即相关性较强, 而粪便中的吡啶代谢通路具微弱影响性。

3.5 肠道菌群和代谢组学的关联分析

本实验结合 Spearman 数据分析方法对 DEC 组、GRA 组与模型组的差异菌群与差异代谢物进行关联分析。如图 9-A、B 所示, DEC 调控肠道菌群中活泼瘤胃球菌属与尿液代谢物吡啶-3-乙酸、S-腺苷高半胱氨酸等呈显著正相关 ($P<0.001$), 而与 melibiose、17 $\alpha,21$ -二羟基孕烯醇酮呈显著负相关 ($P<0.01$); 嗜木聚糖真杆菌属与尿液代谢物 17 $\alpha,21$ -二羟基孕烯醇酮呈显著正相关 ($P<0.01$), 与 S-腺苷高半胱氨酸、5-甲基四氢叶酸等呈显著负相关 ($P<0.01$); 单球菌属与尿液代谢物苯乙酰胺呈显著正相关 ($P<0.01$); 毛螺菌科 NK4A136 群与尿液代谢物苯乙酰胺、17 $\alpha,21$ -二羟基孕烯醇酮、melibiose 呈显著正相关 ($P<0.01, 0.001$), 副沙门氏菌属与之相反; 活泼瘤胃球菌属、未分类鼠杆菌科与粪便代谢物胆固醇乙酸酯呈显著正相关 ($P<0.01$), 而与 7 α -羟基-3-氧代-4-胆甾烯酸酯、Cer (d18:1/18:0) 呈显著负相关 ($P<0.01, 0.001$), 嗜木聚糖真杆菌属、毛螺菌科 NK4A136 群与之相反。如图 9-C、D 所

示, GRA 调控肠道菌群中嗜木聚糖真杆菌属与尿液代谢物 17 $\alpha,21$ -二羟基孕烯醇酮呈显著正相关 ($P<0.01$), 而与 4-羟基苯乙醛呈显著负相关 ($P<0.01$); 毛螺菌科 NK4A136 群与尿液代谢物 17 $\alpha,21$ -二羟基孕烯醇酮、melibiose 呈显著正相关 ($P<0.01, 0.001$), 而与 4-羟基苯乙醛呈显著负相关 ($P<0.01$); 副沙门氏菌属与尿液代谢物苯乙酰胺、4-羟基苯乙醛呈显著正相关 ($P<0.01$), 而与 17 $\alpha,21$ -二羟基孕烯醇酮呈显著负相关 ($P<0.01$); 乳酸杆菌属与尿液代谢物苯乙酰胺呈显著负相关 ($P<0.001$); 乳酸杆菌属与粪便代谢物胆红素呈显著负相关 ($P<0.01$); 胆固醇乙酸酯、胆红素与菌属活泼瘤胃球菌属、副沙门氏菌属呈显著正相关 ($P<0.01$), 而与嗜木聚糖真杆菌属 ($P<0.01$)、毛螺菌科 NK4A136 群 ($P<0.001$) 呈显著负相关。

4 讨论

肠道菌群是疾病预防和治疗的重要靶标, 在维持机体健康的稳态方面发挥着关键作用。对对照组、模型组、DEC 组、GRA 组和 ACC 组肠道菌群结构进行分析, 从 α 多样性结果来看, 给药组的物种丰富度和多样性均显著低于模型组, 可能是由于

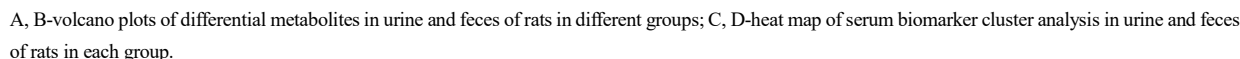
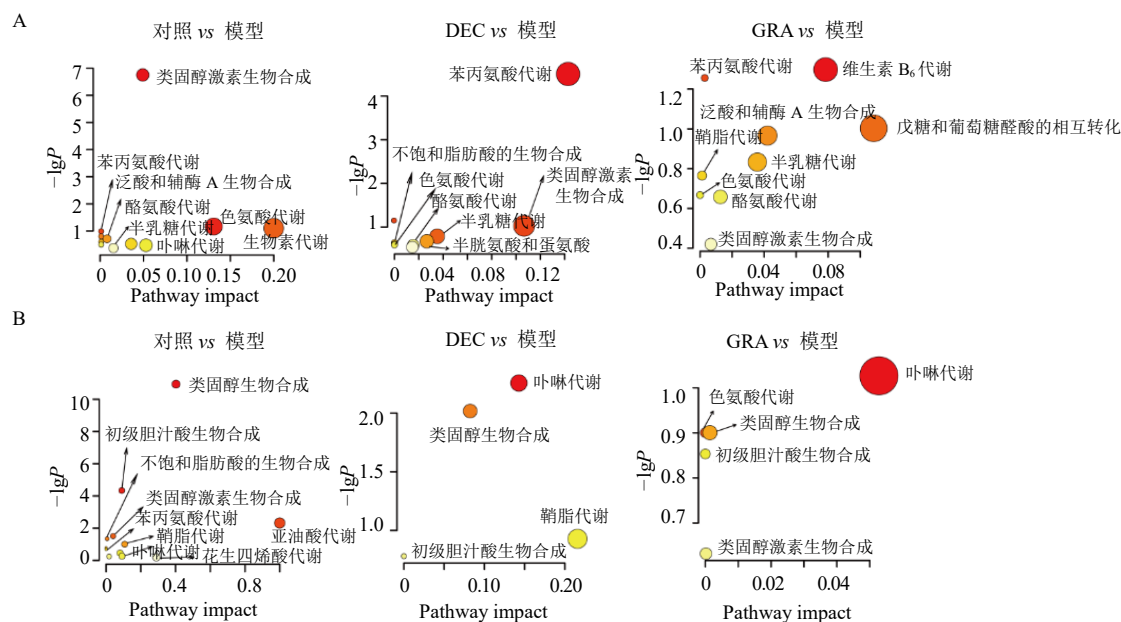


Fig. 7 Differential metabolite identification results in urine and feces of rats in each group ($n = 6$)



A-尿液差异代谢物的 KEGG 气泡图; B-粪便差异代谢物的 KEGG 气泡图。
A-KEGG bubble diagram of differential metabolites in urine; B-KEGG bubble diagram of differential metabolites in feces.

图 8 尿液、粪便样本代谢通路图

Fig. 8 Diagram of differential metabolic pathways in urine and feces

口服给药, 药物对肠道菌群结构的影响改变了物种丰富度和多样性, 提示药物对肠道微生物群的重塑影响较大^[16-17]。层次聚类和 PCoA 结果表明, 给药组大鼠肠道菌群物种组成与模型组相比差异明显, 与对照组大鼠肠道菌群结构较接近, 而给药组之间菌群构成无明显差异, 说明给药后能够纠偏脾胃虚寒型胃病大鼠肠道菌群群落组成, 且药物纠偏效果基本一致。

群落结构图直观展示了各微生物的种类及相对丰度, 门分类水平显示, 大鼠肠道微生物的优势类别包括厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门等^[18]。厚壁菌门与拟杆菌门影响机体能量代谢及脂肪储存, 二者比值 (F/B) 是评估肠道稳态的一个生理指标, 较高的 F/B 值与脾胃虚寒型胃溃疡相关^[19], 当该比值较低时, 意味着肠道菌群的状态较为稳定^[20]。属分类水平显示, 造模后乳酸杆菌属水平显著上升, 给予 DEC 和 GRA 后其水平显著降低, 且 GRA 的调控能力优于 DEC, 有研究表明乳酸杆菌属可以在胃癌患者的胃微生物群中富集^[21], 尽管乳酸杆菌通常被认为对宿主有益, 但高水平的乳酸对胃癌来说可能是有害的, 乳酸可为肿瘤细胞供能, 这可能导致三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 的增多并加剧炎症反应^[22]。造模后经黏液真杆菌属水平显著升高, 有研究表明, 在肠易激综合征和溃疡性

结肠炎患者的粪便微生物群中发现了更高丰度的经黏液真杆菌属, 这可能是引起消化系统病变的原因之一^[23]。DEC 组与 GRA 组相较于模型组, 其活泼瘤胃球菌属水平平均显著升高, DEC 组的调控作用更强, 可能是由于在给药期间, 大鼠正处于自我修复过程, 通过调整菌群数量以维持其菌群的平衡^[24]。有研究发现, 阿克曼氏菌属下的嗜黏蛋白阿克曼菌 (*Akkermansia muciniphila*, AKK) 是一种肠道黏蛋白降解细菌, 可以产生有益的短链脂肪酸 (short chain fatty acids, SCFAs) 和维生素, 减少炎症反应, 维持肠道屏障功能和代谢^[25], 故 GRA 组中富集的阿克曼氏菌属, 可能是通过产生有益的 SCFAs 从而调节肠道炎症, 缓解脾胃虚寒引起的炎症反应。

基于尿液和粪便代谢组学分别分析了 DEC 和 GRA 对脾胃虚寒大鼠尿液和粪便代谢物的影响, 各筛选出 32、39 个潜在的脾胃虚寒生物标志物。其中, 尿液中生物素、21-羟基孕烯醇酮、泛酸及 5-羟基色氨酸^[26]和粪便中胆酸等^[9]为可靠的脾胃虚寒生物标志物, 尿液中皮质酮和粪便中亚油酸、花生四烯酸、9,10-环氧十八碳烯酸、原卟啉 IX 等为可靠的胃部疾病生物标志物, 这些代谢物对于疾病的发生具有重要意义。而 melibiose、17 α ,21-二羟基孕烯醇酮、胆固醇乙酸酯及 7 α -羟基-3-氧代-4-胆甾烯酸酯在以往的研究中鲜有报道, 为本研究新发现的脾胃

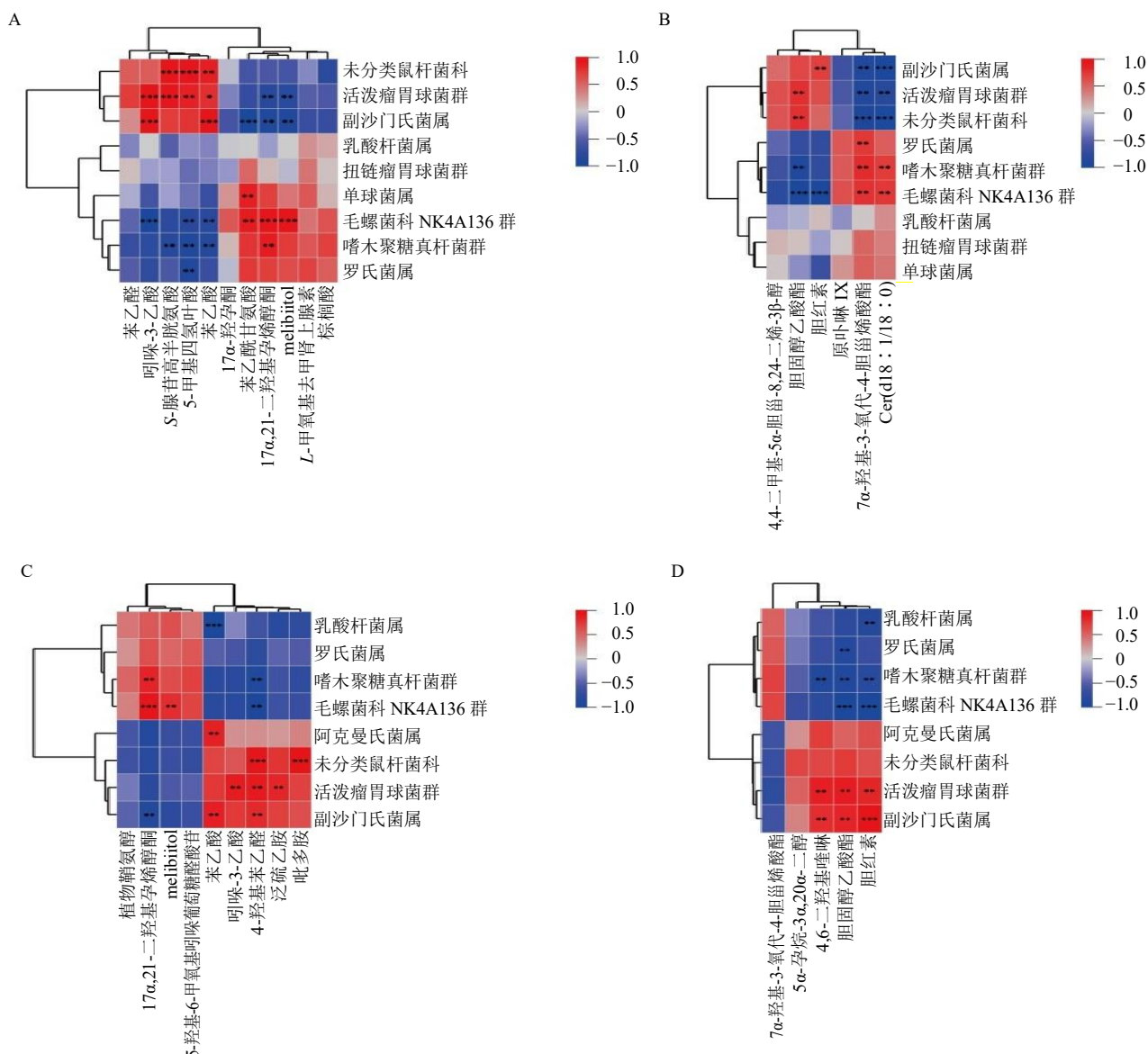


图 9 差异菌属与差异代谢物的相关热图分析 ($n=6$)

Fig. 9 Heat map analysis of correlation between differential bacterial genus and differential metabolites ($n = 6$)

虚寒型胃病相关生物标志物。代谢通路分析结果显示, DEC 和 GRA 可以通过调节尿液中苯丙氨酸代谢、维生素 B₆ 代谢、类固醇激素生物合成和粪便中类固醇生物合成、卟啉代谢等通路缓解大鼠因脾胃虚寒所导致的代谢功能紊乱, 故 DEC 和 GRA 治疗疾病的作用机制可能与调控这些途径有关。

造模后由于大鼠尿液中 5-羟基色氨酸 (5-hydroxytryptophan, 5-HTP) 及 4-(2-氨基苯基)-2,4-二氧代丁酸含量升高而出现色氨酸代谢异常, 色氨

酸代谢异常与胃肠道功能紊乱及其相关消化道疾病之间存在紧密联系,这或许可以解释为何脾胃虚寒证成为众多消化道疾病的常见证型^[26]。5-HTP 作为 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)的前体物质,其含量异常升高,不能转化为 5-HT, 5-HT 是一种普遍存在于中枢和肠神经系统中的肽类物质,胃肠内的 5-HT 由肠嗜铬细胞合成与分泌,与调节胃肠道运动密切相关^[27],其合成受阻会导致胃肠功能紊乱,使大鼠出现大便秘结症状^[28],这与本研究

中模型大鼠出现食欲不振、体质量骤降的状态相符。皮质酮是肾上腺皮质激素,能刺激胃酸分泌并抑制胃黏膜保护物质产生,酪氨酸是皮质酮合成的重要物质,其含量增加促进大量皮质酮合成,两者协同作用释放炎症因子,削弱胃黏膜保护,加剧胃黏膜损伤^[29]。造模后皮质酮及其前体物质 17 α ,21-二羟基孕烯醇酮含量明显升高,验证了模型的合理性,给药后 DEC 组及 GRA 组大鼠 17 α ,21-二羟基孕烯醇酮含量明显下降,说明 DEC 及 GRA 均可能通过调控类固醇激素生物合成发挥治疗作用。胆酸是哺乳动物胆汁中的类固醇酸,通过与甘氨酸或牛磺酸结合,促进脂肪吸收和胆固醇排泄,有研究表明,厚朴温中汤可能通过调节 LysoPA (0:0/18:0)、 α -亚麻酸、胆酸等潜在生物标志物的代谢与生成,干预机体对脂质、糖和甾体激素的代谢,达到治疗脾胃虚寒型慢性胃炎的作用^[9]。造模后,粪便中亚油酸含量降低,有研究表明亚油酸能够通过肠道微生物的作用转化为共轭亚油酸,诱导小肠中产生一种特定类型的免疫细胞,避免肠道病原菌感染^[30]。王高玉等^[31]研究发现,原卟啉 IX 含量在胃癌大鼠模型中升高,并发现铁皮石斛水提物能够阻断胃癌的恶化,其机制可能与卟啉代谢、色氨酸代谢等有关。胆固醇乙酸酯是一种正常的人类胆固醇酯,存在于各种液体和器官中,提示脾胃虚寒可能导致类固醇生物合成异常,使胆固醇乙酸酯合成受阻,从而诱发疾病^[32]。本研究表明,造模后 7 α -羟基-3-氧代-4-胆甾烯酸酯含量上升,而给药后则下降,这一发现提示,脾胃虚寒证导致胃肠动力障碍的机制可能与胆汁酸肝肠循环的破坏及初级胆汁酸生物合成紊乱有关,厚朴温中汤及其配方颗粒可能通过调控这一过程,改善由脾胃虚寒引起的胃肠动力障碍^[33]。以上结果从尿液、粪便代谢物及作用机制角度验证了脾胃虚寒大鼠药理模型的合理性以及厚朴温中汤煎汤及其配方颗粒的有效性。

为了探讨大鼠肠道菌群与体内代谢物是否有依存关系,本研究对给药后大鼠肠道菌群与尿液、粪便代谢组学进行关联分析。有研究表明,小鼠、大鼠和人类的副沙门氏菌分离株都是无糖分解和琥珀酸盐的生产者^[34],本研究发现,给予 DEC 与 GRA 均可显著上调该菌属丰度,且副沙门氏菌属与粪便代谢物胆固醇乙酸酯、胆红素、4,6-二羟基喹啉呈显著正相关,与粪便代谢物 7 α -羟基-3-氧代-4-胆甾烯酸酯、Cer (d18:1/18:0) 呈显著负相关,与

尿液代谢物苯乙酸、吡啶-3-乙酸、4-羟基苯乙醛呈显著正相关,而与尿液代谢物 17 α ,21-二羟基孕烯醇酮、苯乙酰甘氨酸、melibiose 呈显著负相关,提示副沙门氏菌属在类固醇合成、氨基酸代谢、胆汁酸维持、卟啉代谢、糖代谢中具有潜在作用。未分类鼠杆菌科与尿液代谢物 S-腺苷高半胱氨酸、5-甲基四氢叶酸、苯乙酸、4-羟基苯乙醛、吡多胺,与粪便代谢物胆固醇乙酸酯、7 α -羟基-3-氧代-4-胆甾烯酸酯、Cer (d18:1/18:0) 具有显著相关性,据报道,未分类鼠杆菌科能够调节宿主的免疫系统,减轻炎症,抑制有害菌和氧化应激,并改善肠黏膜炎症^[35],提示该菌属通过影响类固醇合成、胆汁酸合成、氨基酸代谢等通路来发挥抗炎作用。这些关系表明,体内某些关键的代谢物与特定细菌群落存在着显著关联,肠道微生物群落能够进一步调控宿主的代谢及相关途径,而这些代谢物可以作为疾病的生物标志物,用于评估疾病的发展阶段或检测治疗效果。

综上,厚朴温中汤煎汤和配方颗粒通过重塑肠道菌群和调节宿主代谢发挥抗脾胃虚寒的作用。二者均通过改善乳酸杆菌属、嗜木聚糖真杆菌属、毛螺菌科 NK4A136 群、罗氏菌属、未分类鼠杆菌科、活泼瘤胃球菌属、副沙门氏菌属的水平,调节大鼠肠道菌群的多样性,以此提高胃肠激素 MTL 和 GAS 的水平,恢复宿主尿液中苯丙氨酸代谢、类固醇激素生物合成、维生素 B₆ 代谢等和粪便中类固醇生物合成、卟啉代谢等代谢紊乱,减轻炎症反应,从而发挥抗脾胃虚寒作用,DEC 和 GRA 对于脾胃虚寒型胃病的干预各有优劣,但整体趋势一致,均能发挥抗脾胃虚寒证的治疗作用。本研究不仅阐明了厚朴温中汤煎汤及其配方颗粒治疗脾胃虚寒型胃病的作用机制提供实验基础,而且为该组方配方颗粒的临床合理应用提供了科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 叶蕊,董红梅,赵琪琳. 中医治疗脾胃虚寒型胃脘痛研究进展 [J]. 中国乡村医药, 2024, 31(2): 74-75.
- [2] 蒋红霞,陈婉君,许炜炜,等. 基于网络药理学研究厚朴温中汤治疗脾胃虚寒型胃病的潜在靶点和机制 [J]. 中国药理学通报, 2023, 39(9): 1764-1773.
- [3] 吴晶晶,刘勤,刘静. 基于胃主通降理论探讨胃病诊疗思路 [J]. 光明中医, 2023, 38(23): 4665-4668.
- [4] 韩广明,赵炜,吕迎春. 温中和胃汤联合耳穴压豆对脾胃虚寒型慢性胃炎患者治疗疗效及对血清 VIP、MTL 水平的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2024, 51(7): 92-96.
- [5] 李玲,季光,张彤,等. 经典名方苓桂术甘汤复方制剂

- 的研制 [J]. 中成药, 2023, 45(10): 3165-3172.
- [6] 李东垣撰, 李一鸣整理. 内外伤辨惑论 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 7.
- [7] 郑碧武. 中药穴位贴敷联合厚朴温中汤加减治疗脾胃虚寒型胃痛的疗效观察 [J]. 基层中医药, 2023, 2(10): 57-62.
- [8] 石宣宣, 欧阳莉, 罗光燕, 等. 厚朴温中汤煎汤与其配方颗粒化学成分及入血成分一致性研究 [J]. 中华中医药学刊, 2025, 43(1): 182-190.
- [9] 闫君, 邬思芳, 刘莉, 等. 基于尿液代谢组学比较厚朴温中汤合煎与单煎对脾胃虚寒大鼠的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(20): 117-123.
- [10] Zhang B X, Liu K, Yang H Y, *et al.* Gut microbiota: The potential key target of TCM's therapeutic effect of treating different diseases using the same method-UC and T2DM as examples [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 855075.
- [11] 武静, 田维毅, 蔡琨, 等. 中药与肠道菌群相互作用机制研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2024, 40(10): 1823-1829.
- [12] 徐杨, 何芷绮, 刘晓凤, 等. 代谢组学在中药复方制剂领域的研究进展及面临的挑战 [J]. 中草药, 2024, 55(4): 1354-1364.
- [13] 石宣宣, 陈家毅, 陈殊, 等. 基于脾胃虚寒大鼠的厚朴温中汤体内外成分鉴定及药代动力学分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(17): 145-154.
- [14] 周朝忠, 李晶, 张光磊, 等. 一种厚朴温中汤汤剂及基准样品特征图谱的建立及含量测定方法: 中国, CN 115508491 A [P]. 2022-12-23.
- [15] Zhang K, Peng P, Huang J, *et al.* Integrating plasma metabolomics and gut microbiome to reveal the mechanisms of Huangqi Guizhi Wuwu Decoction intervene diabetic peripheral neuropathy [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319(3): 14.
- [16] Lin T L, Lu C C, Lai W F, *et al.* Role of gut microbiota in identification of novel TCM-derived active metabolites [J]. *Protein Cell*, 2021, 12(5): 394-410.
- [17] Wang C, Jiang S Y, Zheng H Y, *et al.* Integration of gut microbiome and serum metabolome revealed the effect of Qing-Wei-Zhi-Tong Micro-Pills on gastric ulcer in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319: 117294.
- [18] Wang Y X, Zhang J Y, Cao Y M, *et al.* *Coptis chinensis*-induced changes in metabolomics and gut microbiota in rats [J]. *Am J Chin Med*, 2023, 51(6): 1547-1576.
- [19] 余凌英, 李星, 蔡平君, 等. 干姜和炮姜对脾胃虚寒型胃溃疡大鼠药效学指标及肠道菌群的影响 [J]. 中国药房, 2022, 33(20): 2460-2465.
- [20] 秦百君, 唐曦平, 杨昕, 等. 清解化攻方调节重症急性胰腺炎模型大鼠肠道菌群及对肠黏膜屏障的影响 [J]. 中国药房, 2022, 33(15): 1825-1832.
- [21] Ferreira R M, Pereira-Marques J, Pinto-Ribeiro I, *et al.* Gastric microbial community profiling reveals a dysbiotic cancer-associated microbiota [J]. *Gut*, 2018, 67(2): 226-236.
- [22] Bali P, Coker J, Lozano-Pope I, *et al.* Microbiome signatures in a fast- and slow-progressing gastric cancer murine model and their contribution to gastric carcinogenesis [J]. *Microorganisms*, 2021, 9(1): 189.
- [23] 王晓梅. 肠易激综合征和溃疡性结肠炎患者肠道菌群和肥大细胞的变化 [J]. 广东医学, 2015, 36(5): 756-758.
- [24] Jiao J Y, Liu J J, Luo F, *et al.* Qingyi granules ameliorate severe acute pancreatitis in rats by modulating the gut microbiota and serum metabolic aberrations [J]. *Pharm Biol*, 2023, 61(1): 927-937.
- [25] Ioannou A, Berkhout M D, Geerlings S Y, *et al.* *Akkermansia muciniphila*: Biology, microbial ecology, host interactions and therapeutic potential [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2025, 23: 162-177.
- [26] 梁琦, 张卫, 梁瑜, 等. 脾胃虚寒证代谢谱特征及姜枣暖九味颗粒作用机制研究 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2020, 28(4): 243-250.
- [27] 邵璐, 刘杨, 唐阿梅, 等. 茯苓甘草汤对功能性消化不良大鼠血清中胃动素、胃泌素及 5-羟色胺的影响 [J]. 贵阳中医学院学报, 2019, 41(5): 11-15.
- [28] 邓亚玲, 夏澜婷, 张金莲, 等. “建昌帮”传统特色炮制煨附片对脾肾阳虚大鼠胃肠功能的影响 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(12): 2913-2916.
- [29] 于婷, 包永睿, 孟宪生, 等. 基于代谢组学的大鼠实验性反流性胃炎模型研究 [J]. 中国新药杂志, 2015, 24(3): 337-343.
- [30] Song X Y, Zhang H H, Zhang Y B, *et al.* Gut microbial fatty acid isomerization modulates intraepithelial T cells [J]. *Nature*, 2023, 619(7971): 837-843.
- [31] 王高玉, 刘红宁, 戈淑超, 等. 铁皮石斛水提物对胃癌前病变作用的尿液代谢组学分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(21): 77-85.
- [32] Schiffer L, Barnard L, Baranowski E S, *et al.* Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: A comprehensive review [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2019, 194: 105439.
- [33] 马荣, 谢倩, 王建, 等. 基于代谢组学研究厚朴远志配伍醇提物对尿液代谢物的影响 [J]. 中国药理学通报, 2019, 35(6): 870-877.
- [34] Ju T T, Kong J Y, Stothard P, *et al.* Defining the role of *Parasutterella*, a previously uncharacterized member of the core gut microbiota [J]. *ISME J*, 2019, 13(6): 1520-1534.
- [35] Xie J, Tian S M, Liu J, *et al.* Combination therapy with indigo and indirubin for ulcerative colitis via reinforcing intestinal barrier function [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2023, 2023: 2894695.

[责任编辑 李亚楠]