

# 基于化学成分与肠道菌群探讨消癌解毒方中黄连-乌梅药对的配伍机制

史悦华<sup>1,2</sup>, 范汇森<sup>2,3</sup>, 刘晓<sup>3,4</sup>, 肖平<sup>3</sup>, 沈卫星<sup>2</sup>, 程海波<sup>2</sup>, 孙东东<sup>2</sup>

(1.东南大学附属中大医院,江苏南京 210009;2.江苏省中医药防治肿瘤协同创新中心,国家中医药管理局名医验方评价与转化重点实验室,江苏南京 210023;3.南京中医药大学药学院,江苏南京 210023;4.南京中医药大学国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心,江苏南京 210023)

**摘要:**目的 探讨黄连-乌梅药对与消癌解毒方水煎液中部分生物碱类成分的含量差异,并比较药对与全方对小鼠肠道菌群的影响。方法 采用 Extend-C<sub>18</sub>(100 mm×2.1 mm,1.8 μm)色谱柱,以 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B)进行梯度洗脱,流速 0.3 mL/min,柱温 35 °C,进样量 2 μL;离子化模式为电喷雾离子化(ESI),以正离子模式检测,开展方法学验证和含量测定研究。按照给药不同将小鼠分为正常组、全方高浓度组、全方低浓度组、药对高浓度组和药对低浓度组,连续灌胃给药 7 d,每组分别收集粪便样本,进行 16S rRNA 基因测序。结果 建立的含量测定方法在一定浓度范围内线性关系良好,方法学验证结果均符合相关要求,木兰花碱与非洲防己碱在黄连、药对以及全方中的含量分别为:(4.433±0.133)(8.905±0.154) mg/g,(3.545±0.033)(9.170±0.051) mg/g,(5.287±0.038)(13.861±0.690) mg/g。全方组和药对组中拟杆菌门 *Bacteroides* 的丰度均高于正常组,而全方组和药对组中厚壁菌门 *Firmicutes* 的丰度均低于正常组。药对高浓度组中的疣微菌门 *Verrucomicrobia* 和变形菌门 *Proteobacteria* 的丰度高于其他组。结论 液质联用方法和相关参数简便、可靠,可用于有关成分的含量检测。与单味药中含量相比,经过药对配伍后,非洲防己碱含量增加,而木兰花碱含量则略有降低;经过全方配伍后,2 种成分的含量均增加。此外,肠道菌群实验表明无论是药对还是全方在给药后,会不同程度地影响肠道菌群内部占比改变,其可能对调节肠道系统平衡,具有一定帮助作用,从而为进一步阐释黄连-乌梅在消癌解毒方中配伍机制提供了参考和依据。

**关键词:**黄连-乌梅;配伍;肠道菌群;16S rRNA 基因测序;含量测定

中图分类号:R289.1 文献标志码:A 文章编号:1672-0482(2019)02-0199-06

DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2019.0199

引文格式:史悦华,范汇森,刘晓,等.基于化学成分与肠道菌群探讨消癌解毒方中黄连-乌梅药对的配伍机制[J].南京中医药大学学报,2019,35(2):199-204.

## The Study of Compatibility Mechanism of *Coptidis Rhizoma*-*Mume Fructus* in Xiaoi Jiedu Prescription from Perspective of Chemical Components and Intestinal Microflora

SHI Yue-hua<sup>1,2</sup>, FAN Hui-sen<sup>2,3</sup>, LIU Xiao<sup>3,4</sup>, XIAO Ping<sup>3</sup>, SHEN Wei-xing<sup>2</sup>, CHENG Hai-bo<sup>2</sup>, SUN Dong-dong<sup>2</sup>

(1. Affiliated Zhong Da Hospital of Southeast University, Nanjing, 210009, China; 2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Traditional Chinese Medicine (TCM) Prevention and Treatment of Tumor, Key Laboratory of SATCM for Empirical Formulae Evaluation and Achievements Transformation, Nanjing, 210023, China; 3. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China; 4. Engineering Center of State Ministry of Education for Standardization of Chinese Medicine Processing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To explore the difference of some alkaloids in *Coptidis Rhizoma*-*Mume Fructus* decoction and Xiaoi Jiedu Prescription, and compare their effects on the intestinal flora of mice. **METHODS** The separation was performed on Extend-C<sub>18</sub> column (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) with 0.1% aqueous formic acid (A)-acetonitrile solution (B) as the mobile phase for gradient elution. The flow rate was 0.3 mL/min, column temperature was set at 35 °C, and injection volume was 2 μL. Electrospray ionization source was applied for the analysis under positive ion model. The method was validated and the samples were determined under this condition. 50 mice were divided into ZC group, QFH group, QFL group, YDH group and YDL group according to different dosages. After 7 days of oral administration, fecal samples from each group were collected for 16S rRNA gene sequencing. **RESULTS** The established detection method showed good linearity within certain concentra-

收稿日期:2018-10-23

基金项目:国家自然科学基金(81673559,81573910,81403079);江苏省自然科学基金(BK20161045);江苏高校自然科学基金(16KJB360001);江苏高校优势学科建设工程资助项目

第一作者:史悦华,女,主治医师,博士研究生,E-mail:275571301@qq.com

通信作者:孙东东,男,副研究员,主要从事中药物质基础研究,E-mail:sun\_21373@163.com;

程海波,男,教授,主要从事中医药防治肿瘤研究,E-mail:nzychb@163.com

tion ranges and the method validation results meet the relevant requirements. The contents of magnoflorine and columbamine in the single herb, herb pair and formula decoction were  $(4.433 \pm 0.133)$  and  $(8.905 \pm 0.154)$  mg/g,  $(3.545 \pm 0.033)$  and  $(9.170 \pm 0.051)$  mg/g,  $(5.287 \pm 0.038)$  and  $(13.861 \pm 0.690)$  mg/g, respectively. In addition, the abundance of *Bacteroides* in QF and YD were higher than that in the normal group, but the abundance of *Firmicutes* was opposite. Interestingly, we found that the abundance of *Verrucomicrobia* and *Proteobacteria* in YDH were higher than other groups. **CONCLUSION** The method and related parameters were simple and reliable, which could be used to detect the content of related components. Compared with single herb, the content of columbamine was increased both in herb pair and Xiaoi Jiedu Prescription; the content of magnoflorine was decreased slightly in herb pair, while increased in Xiaoi Jiedu Prescription. After administering herb decoction, the change of intestinal flora diversity revealed *Coptidis Rhizoma - Mume Fructus* decoction and Xiaoi Jiedu Prescription could regulate the balance of intestinal system. The results further explain the compatibility mechanism of the two drugs in this prescription.

**KEY WORDS:** *Coptidis Rhizoma-Mume Fructus*; compatibility; intestinal flora; 16S rRNA gene sequencing; content determination

黄连与乌梅的配伍使用最早载于《伤寒论·辨厥阴病脉证并治》338 条：“蛔厥者，乌梅丸主之。有主久利”。作为乌梅丸中的经典药对，黄连与乌梅配伍符合酸苦合法，取乌梅之酸和黄连之苦寒，既能酸敛柔肝、又能清热燥湿，两味药相互依存、相互制约，协同增强疗效。近来有研究表明，黄连与乌梅配伍能有效控制肠道腺瘤发生及其癌变，其作用机制可能与抑制炎症和上皮间质转化有关<sup>[1-2]</sup>。亦有报道两者配伍之后对于黄连中生物碱溶出度具有一定影响<sup>[3]</sup>。课题组在癌毒病机理论指导下，针对结直肠癌腺瘤性息肉的基本病机“脾虚毒蕴”，创制了防治结直肠癌前病变的消癌解毒方，前期研究发现消癌解毒方能够显著降低结直肠癌腺瘤性息肉再发、复发及癌变率<sup>[4-6]</sup>，黄连-乌梅亦是该方中关键药对。

中药配伍体现了中医整体思维、辨证论治优势，复方通过煎煮，往往以汤剂形式，通过多组分、多靶点，影响肠道微生态等实现综合药效。人的肠道内部栖息着大量菌群，它们的状态不仅直接影响着胃肠功能的运行，而且参与机体的多种代谢途径，与许多疾病息息相关，诸如糖尿病、肥胖、炎症等<sup>[7-10]</sup>。作为防治肠道肿瘤的有效验方，本实验通过比较药对与消癌解毒方中的潜在活性成分的差异以及对小鼠肠道菌群的影响，尝试以不同的视角阐释复方配伍的科学性，对于促进临床与基础研究之间的转化具有积极意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 药材 黄连 *Coptidis Rhizoma* (四川, 批号: 170613)、炮姜 *Zingiberis Rhizoma Praeparatum* (安徽, 批号: 170529)、白花蛇舌草 *Oldenlandia diffusa* (江苏, 批号: 180714) 均购于江苏华洪药业科技有限公司; 乌梅 *Mume Fructus* (四川, 批号:

171207)、苦参 *Sophorae Flavescens Radix* (内蒙古, 批号: 171122)、党参 *Codonopsis Radix* (甘肃, 批号: 180607)、白术 *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* (浙江, 批号: 180408)、生薏苡仁 *Coicis Semen* (贵州, 批号: 180523) 购于江苏亚邦中药饮片有限公司, 以上药材由南京中医药大学陈建伟教授鉴定。

1.1.2 实验动物 Balb/c 雄性小鼠 50 只, 体质量为  $(20 \pm 2)$  g, 由南京市江宁区青龙山动物繁殖场提供, 许可证号: SCXK(苏)2017-0001。

1.1.3 试剂 木兰花碱、非洲防己碱(上海源叶生物科技有限公司, 批号: B20882、B20391, 纯度  $\geq 98\%$ ); 甲醇(德国 Merck 公司)、乙腈(德国 Merck 公司)、甲酸(Anaqua Chemical Supply)均为质谱级; Powerfecal DNA Isolation Kit 试剂盒(美国 MoBio 公司); 琼脂糖(美国英杰生命技术有限公司); TruSeqNano DNA LT Library Prep Kit 试剂盒(Illumina 公司); 生理盐水(江苏亚邦药业集团); Axy Prep DNA 凝胶回收试剂盒(康宁生命科学有限公司)。

1.1.4 仪器 质谱仪(ABSCIEXTQ 5500, 美国 AB 公司); 凝胶成像系统(BG-gdsAUTO520, 北京百晶生物技术有限公司); 电泳仪(Mini-PROTEAN Tetra System, 美国 BIO-RAD 公司); 超纯水仪器(EPED-E2-30TF, 南京易普易达科技发展有限公司); 分析天平(ML204, 梅特勒-托利多(上海)有限公司); 离心机(Allegra X-12R, 美国 BECKMAN COULTER 公司); 紫外分光光度计(G9-双通路, 南京菲勒仪器有限公司); 冷冻干燥机(NO38-85-600, 美国 LABCONCO 公司); 粉碎机(永康市天祺盛世有限公司)。

### 1.2 方法

### 1.2.1 水煎液中化学成分含量测定

1.2.1.1 水煎液的制备 黄连单煎液:取黄连药材 10 g,加水浸泡 1 h,加入 10 倍量水煎煮 2 h,纱布过滤,滤渣加入 8 倍量水煎煮 1.5 h,收集合并 2 次滤液,减压浓缩至含生药量 0.1 g/mL,4 °C 保存。

黄连-乌梅合煎液:取黄连 3 g,乌梅 12 g,按照上述方法,制备黄连-乌梅合煎液。

全方煎液:按照全方配比,取黄连 3 g,炮姜 6 g,白花蛇舌草 20 g,乌梅 12 g,苦参 9 g,党参 15 g,白术 12 g,生薏苡仁 30 g,按照上述方法,制备全方煎液。

1.2.1.2 供试品溶液的制备 分别取制备好的黄连单煎液、黄连-乌梅合煎液和全方合煎液 1 mL,加入 9 mL 甲醇,充分混合后高速离心(12 000 r/min,10 min),取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,得供试品溶液。

1.2.1.3 标准品溶液的制备 精密称取木兰花碱 0.24 mg、非洲防己碱 0.10 mg 分别于 5 mL 容量瓶中,加甲醇定容至刻度,得对照品母液备用。

1.2.1.4 色谱条件 色谱分离使用:Extend-C<sub>18</sub> 色谱柱(100 mm×2.1 mm,1.8 μm),流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~0.01 min,5%~10% B;0.01~1 min,10%~65% B;1~2 min,65%~80% B;2~5 min,80%~100% B;5~6 min,100% B;6~7 min,100%~10%;7~8 min,10%~10%),流速 0.3 mL/min,柱温 35 °C,进样量 2 μL。

1.2.1.5 质谱条件 质谱检测条件:检测方式:多反应检测(MRM),喷雾电压(IS):4 500 V,气帘气(CUR):35 psi,雾化气(GS1):55 psi,辅助加热气(GS2):55 psi,辅助气温度(TEM):550 °C。待测化合物均在正离子模式下进行检测,木兰花碱和非洲防己碱的检测离子质荷比( $m/z$ )分别为 343.1/298.2 和 339.2/323.2 ( $m/z$ ),去簇电压(DP)为 148.940、123.330 V,裂解电压(CE)为 28.920、37.110 V,碰撞室出口电压(CXP)均为 -17 V。

### 1.2.2 肠道菌群实验

1.2.2.1 药液制备 在 1.2.1.1 条件下制备的药对水煎液和全方合煎液,分别 60 °C 减压浓缩至 2 g/mL,备用。

1.2.2.2 实验动物分组及给药 将 Balb/c 雄性鼠 50 只分为 5 组:正常组(ZC)、全方高浓度组(QFH)、全方低浓度组(QFL)、药对高浓度组(YDH)和药对低浓度组(YDL)。高浓度给药组给

药量为 20 g/kg,低浓度给药组给药量为 5 g/kg,正常组给予等量生理盐水,连续灌胃给药 7 d。饲养期间小鼠正常的喂养、饮食,放置在正常进行昼夜温差的环境中。第 7 天晚禁食,24 h 后所有小鼠眼眶取血,脱颈椎处死。

1.2.2.3 粪便样品采集与处理 每组随机抽取 3 只小鼠进行样品的采集,将待取样的小鼠放进干净的代谢笼中,在其下方铺放无菌滤纸,小鼠排便后,立即使用消毒后的镊子,收集新鲜粪便样本,每只小鼠均单独使用一张滤纸。每只小鼠需要收集 3~5 粒速冻,保存在 -80 °C 冰箱里,干冰运送。

1.2.2.4 肠道菌的 DNA 提取与 Illumina 高通量测序 在提取肠道菌之前首先对样本(小鼠粪便)进行解冻、混匀,取 0.25 g 进行 DNA 的提取,使用美国 MoBio 公司的 Powerfecal DNA Isolation Kit 试剂盒参照使用说明对样品中的 DNA 进行提取。提取出的 DNA 在用 0.8% 的琼脂糖凝胶检测抽提,再用紫外分光光度计进行定量,最后将其用无菌水稀释为 1 mg/L,将样本放置 -20 °C 中保存。由于肠道中的细菌种类繁多,体外培植可行性不高且误差较大,所以选择更为准确、详细的高通量测序来对肠道微生态进行全面系统的检测和观察<sup>[11]</sup>。

将提取出的 DNA 样本进行 PCR(聚合酶链式反应),采用 TransGen AP 221-02:TransStart Fast-pfu DNA 聚合酶反应体系,重复反应 3 次,使其彻底反应完全,再采用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。用 Axy Prep DNA 凝胶回收试剂盒,使用 Tris-HCL 进行洗脱,回收 PCR 产物。再将回收产物用 QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统进行检测。测序得到的 Paired-end reads 根据 overlap 关系进行拼接后筛选,进行后续的 OTU 聚类。本次实验由上海美吉生物医药科技有限公司对样品进行 16S rRNA 基因 V4 区的 PCR 扩增和 Illumina 高通量测序,在其提供的 X-Sanger 云平台进行数据的整理以及结果的分析。

1.2.2.5 数据学方法 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理,多样本均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为有显著差异。

## 2 结果

### 2.1 方法学验证

2.1.1 线性关系考察 精密移取木兰花碱、非洲防己碱对照品溶液母液适量至 5 mL 容量瓶,甲醇定容至刻度,摇匀,配成浓度分别为 2、0.83 μg/mL 的

混合对照品溶液,并逐级稀释成系列不同浓度的对照品溶液,木兰花碱(7.810、15.625、31.25、62.5、125、250 ng/mL)、非洲防己碱(6.510、13.02、26.04、52.08、104.16、208.32 ng/mL),进行测定,记录色谱图,以峰面积对浓度做线性回归,得木兰花碱、非洲防己碱的回归方程,见表 1。

表 1 木兰花碱、非洲防己碱线性回归数据

对照品	标准曲线	$r$	线性范围/ (ng · mL <sup>-1</sup> )
木兰花碱	$Y=12\ 763.568X+134\ 006$	0.999 2	7.810~250
非洲防己碱	$Y=26\ 344.203X+117\ 620$	0.999 4	6.510~208.33

2.1.2 检测限与定量限考察 以信噪比 S/N=3 和信噪比 S/N=10 时分别计算检测限和定量限。结果木兰花碱和非洲防己碱的检测限分别为:0.03、0.01 ng/mL,定量限分别为:0.1、0.03 ng/mL。

2.1.3 精密度实验 在 1.2.1.2 项下制备供试品溶液,连续进样 6 次,木兰花碱、非洲防己碱色谱峰面积的 RSD 分别为:2.2%和 4.8%。

2.1.4 稳定性实验 取同一样品溶液,分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样,以峰面积计算,木兰花碱、非洲防己碱的 RSD 分别为:1.63%和 1.68%,结果表明,在 4 °C 条件下,供试品溶液中各成分在 24 h 内稳定。

2.1.5 重复性实验 按照 1.2.1.2 项下方法平行制备 6 份供试品,在 1.2.1.4 条件下进样分析,测定木兰花碱、非洲防己碱的峰面积,计算其 RSD 分别为:1.63%和 1.68%,表明方法重复性良好。

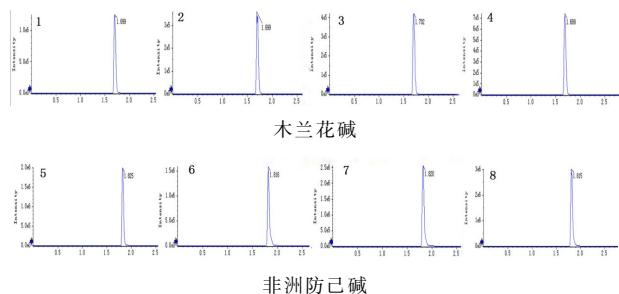
## 2.2 样品含量测定

按照 1.2.1.1 项下制备操作,制备 6 份全方水煎液,6 份黄连-乌梅合煎液和 6 份黄连单煎液,将得到的水煎液按照 1.2.1.2 项下处理,进样测定,根据标准曲线计算 2 种成分的含量,样品含量测定结果用平均值±标准偏差来表示,结果见表 2,与单味药相比,木兰花碱在药对中的含量呈下降趋势,在全方中呈上升趋势;非洲防己碱在药对和全方中均呈上升趋势。标准品和样品的 2 种被检测化合物的 MRM 提取离子流图见图 1。

## 2.3 小鼠肠道菌群测序结果

本次送检筛选后每组包括 3 个样品,根据 16S rRNA 的测序结果,各组的 OTU 统计结果见表 3。图 2 的分析结果表明,各组之间具有显著性差异。图 3 的聚类结果可知第一主成分 PC1 和第二主成分 PC2 的贡献率分别为 28.15%和 14.77%,YDH 组与其他各组间的微生物群落物种具有明显差异。

图 4 显示在各组中拟杆菌门 *Bacteroides*、厚壁菌门 *Firmicutes* 的丰度均较高,为优势菌群;其中给药组(包括 QFL 组、QFH 组、YDL 组和 YDH 组)中拟杆菌门的丰度均高于正常组,而给药组中厚壁菌门的丰度均低于正常组。此外,YDH 组中的疣微菌门 *Verrucomicrobia* 和变形菌门 *Proteobacteria* 的丰度高于其他组。在其他各检测菌门中,各组所含菌门的丰度差异不大。在图 5 中,通过将高丰度和低丰度的物种分块聚集,依靠颜色变化与相似程度来反映各组中各样本在门水平上群落组成的相似性和差异性。从 Heatmap 图可知,在药对组中变形菌门 *Proteobacteria* 的丰度值显著高于全方组。从该热图中也可以看出拟杆菌门 *Bacteroides* 和厚壁菌门 *Firmicutes* 的物种丰度最高,为优势菌门,且药对组中疣微菌门 *Verrucomicrobia* 丰度明显高于全方两组。图 6 为各组样本的层级聚类树,观察该图可以发现,5 组样本根据层级聚类被分为了四类,其中正常组、YDH 组、QFL 组各自为一类,YDL 组和 QFH 组为一类,表明其有很高的相似性。



1,5.混标;2,6.黄连;3,7.黄连-乌梅;4,8.全方

图 1 各组化学成分离子提取流图

表 2 各组样品中木兰花碱和非洲防己碱含量( $\bar{x} \pm s$ , mg · g<sup>-1</sup>, n=6)

样品	木兰花碱	非洲防己碱
全方	5.287±0.038	13.861±0.690
黄连-乌梅药对	3.545±0.033	9.170±0.051
黄连	4.433±0.133	8.905±0.154

表 3 各组小鼠粪便中含有的平均 OTU 数量( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

组别	平均 OTU 数量
ZC	403±24
QFH	322±62
QFL	358±14
YDH	236±38
YDL	326±17

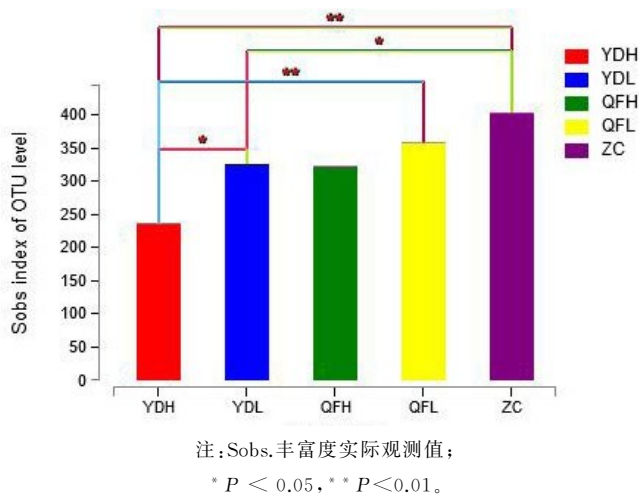


图2 组间差异检验直方图

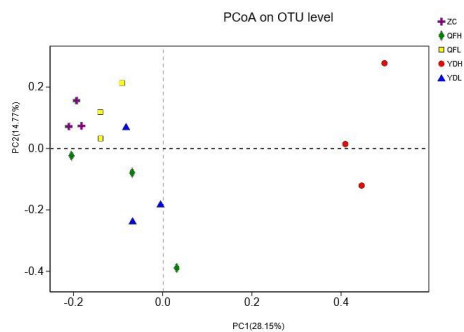


图3 微生物群落间的差异分析

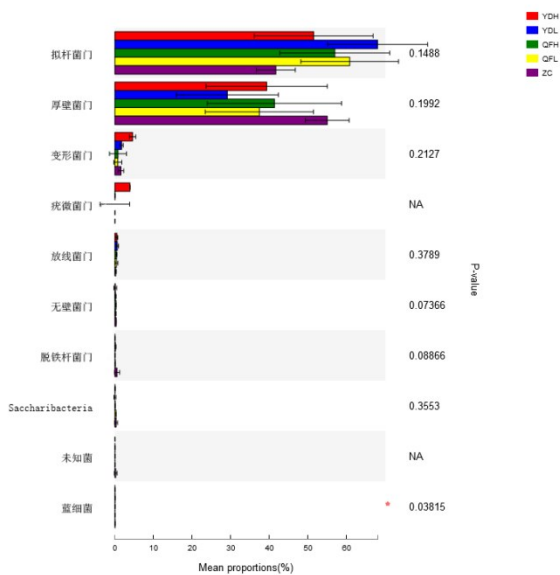


图4 微生物群落中丰度差异显著的物种分析

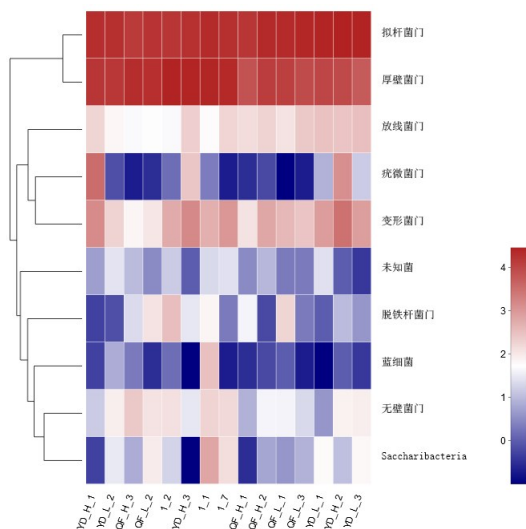


图5 不同组间各物种门水平上群落组成的相似性与差异性

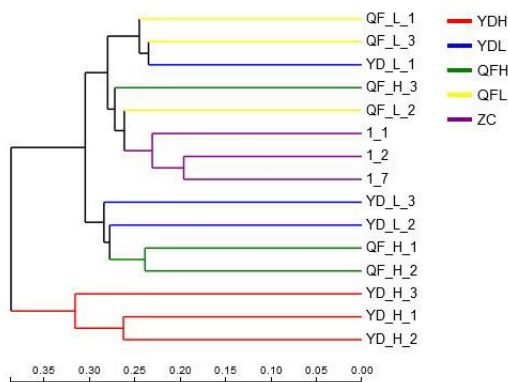


图6 各组样本的层级聚类树图

### 3 讨论

在健康状态下,肠道菌群与人体和肠道微环境保持着平衡状态,一旦宿主免疫力改变、环境变化等因素导致平衡状态被破坏,则肠道菌群结构改变造成肠道微环境的变化,损伤肠上皮细胞,导致炎症肠病及癌症等疾病的发生<sup>[12]</sup>。而肠道菌群具有可恢复性,在平衡被破坏后,会促使菌群恢复原平衡态或达到另外一个平衡态。这体现了肠道菌群对于疾病的发生发展具有促进或抑制作用。邹忠杰等<sup>[13]</sup>在实验中发现黄连总生物碱可以缓解大鼠脂质和糖代谢异常和调节大鼠肠道菌群。郑进保<sup>[14]</sup>发现,黄连提取物可以有效抑制致病菌的生长。此外,文献报道黄连中的生物碱类成分木兰花碱和非洲防己碱具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化等药理活性<sup>[15-16]</sup>,提示2种生物碱类成分可能在消除不良肠道微环境、抑制致病菌和促进益生菌等方面具有潜在活性,对调节肠道菌群具有可期性。因此本实验选取上述2种单

体,作为配伍前后成分含量变化的检测项,后续将通过有关药理药效试验进行进一步验证和补充。实验考察了水相加入甲酸(0.1%、0.05%)和纯水对色谱峰和响应值的影响。使用纯水时,木兰花碱和非洲防己碱的色谱峰峰形较差,有严重拖尾现象,且响应值较低。当水相中加入甲酸时,拖尾现象改善,且随着甲酸浓度的升高响应值也逐步升高,无论是峰形还是响应值 0.1%均优于 0.05%。因此最终选择水相中加入 0.1%甲酸,同时测定木兰花碱和非洲防己碱。在质谱分析中,笔者对分别对正、负离子检测模式进行了考察。结果显示木兰花碱和非洲防己碱在正离子模式下响应较好,故采用正离子检测模式对这两种成分进行同时测定。

在本次的肠道菌群实验中,着重分析了全方、药对以及正常组之间的差异性。实验结果表明全方给药组、药对给药组以及正常组中小鼠肠道菌群的主要门类组成大致相同,分别为:拟杆菌门 *Bacteroidetes*、厚壁菌门 *Firmicutes*、蓝菌 *Cyanobacteria*、放线菌 *Actinobacteria*、疣微菌门 *Verrucomicrobia*、变形菌门 *Proteobacteria*、未知菌、脱铁杆菌门 *Deferribacteres*、无壁菌门 *Tenerioutes* 和 *Saccharibacteria* 菌,其中占比例最高的为:拟杆菌门 *Bacteroidetes*、厚壁菌门 *Firmicutes*,这一结果与“远端肠道优势菌群的细菌门占 90%以上”的说法相印证<sup>[17]</sup>。据文献报道<sup>[18]</sup>,拟杆菌门 *Bacteroidetes* 作为优势菌可以通过自身的定植直接抑制其他有害菌群的粘附,而且在菌群失调时重新引入拟杆菌,可以尽快使宿主肠道内微生态体系恢复平衡状态,同时在促进宿主免疫系统发育以及提高宿主的免疫力方面均有着举足轻重的作用。而且 Wang 等<sup>[19]</sup>发现直肠癌患者的肠道主要菌群比例发生明显变化,厚壁菌门的菌群占比从正常人群的 57.2%上升至 63.1%,拟杆菌门从 32.0%降至 22.7%。与此相印证的是,在本实验结果中显示给药后可以调节厚壁菌门菌群占比下降,促进拟杆菌门菌群占比上升。这提示我们给药后会影响到肠道菌群内部占比改变,对于消除肠道系统紊乱,恢复肠道系统平衡,具有一定帮助作用,并且黄连-乌梅药对的这一功能尤为显著。

综上所述,药对与全方中化学成分的特点及差异性,可能是小鼠给药后肠道菌群多样性发生改变并存在差别的主要因素,所测单体的含量变化是否

与菌群变化存在某种联系,需要进一步探讨和佐证,实验结果为进一步阐释黄连-乌梅在消癌解毒方中配伍机制提供了参考和依据。

#### 参考文献:

- [1] 王琼,刘沈林,严士海,等. 乌梅黄连复方对人结肠癌细胞 HT29 增殖和迁移的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(6):538-541.
- [2] 朱莹莹,王琼,刘沈林,等. 乌梅黄连复方对人结肠癌 Lovo 和 HT29 细胞株抗增殖作用的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(11):2346-2348.
- [3] 江晓,李沙沙,张斌,等. 黄连乌梅药对不同配伍比例的指纹图谱研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(10):195-197.
- [4] 谭佳妮,石文静,沈卫星,等. 消癌解毒方对结肠癌的抑制作用及对 Treg 细胞的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2017, 33(5):515-518.
- [5] 石文静,谭佳妮,沈卫星,等. 消癌解毒方对结肠癌的抑制作用及机制探讨[J]. 中华中医药杂志, 2018, 34(1):69-72.
- [6] 石文静,谭佳妮,沈卫星,等. 消癌解毒方含药血清对人结肠癌细胞增殖及糖酵解过程的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(20):120-125.
- [7] NICHOLSON JK, HOLMES E, KINROSS J, et al. Host-gut microbiota metabolic interactions[J]. Science, 2012, 336(6086):1262-1267.
- [8] KARLSSON FH, TREMAROLI V, NOOKAEW I, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control[J]. Nature, 2013, 498(7452):99-103.
- [9] CANI PD. Gut microbiota and obesity: lessons from the microbiome[J]. Brief Funct Genomics, 2013, 12(4):381-387.
- [10] GEVERS D, KUGATHASAN S, DENSON LA, et al. The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease[J]. Cell Host Microbe, 2014, 15(3):382-392.
- [11] 王雪,赵龙玉,赵凤春,等. 应用 Illumina 高通量测序技术探究长根菇多糖对小鼠肠道菌群的影响[J]. 食品科学, 2015, 36(19):222-226.
- [12] 贾盛佼,王莉莉,于新娟,等. 肠道菌群参与结直肠癌发生的模式[J]. 世界华人消化杂志, 2013, 21(9):779-784.
- [13] 邹忠杰,龚梦鹃,谢媛媛,等. 黄连总生物碱对乙醇致大鼠胃黏膜损伤保护作用的代谢组学研究[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(3):807-810.
- [14] 郑进保. 药用植物提取物在控制酒精发酵染菌和抑制肠道有害菌中的初步研究[D]. 厦门:厦门大学, 2008.
- [15] GUO S, JIANG K, WU H, et al. Magnoflorine ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via suppressing NF-kappaB and MAPK activation[J]. Front Pharmacol, 2018, 9:982.
- [16] BAO M, CAO Z, YU D, et al. Columbamine suppresses the proliferation and neovascularization of metastatic osteosarcoma U2OS cells with low cytotoxicity[J]. Toxicol Lett, 2012, 215(3):174-180.
- [17] 魏晓,刘威,袁静,等. 人类肠道菌群与疾病关系的元基因组学研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(1):75-80.
- [18] 李亚丹,任宏伟,吴彦彬,等. 拟杆菌与肠道微生态[J]. 微生物学通报, 2008, 35(2):281-285.
- [19] WANG T, CAI G, QIU Y, et al. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers[J]. ISME J, 2012, 6(2):320-329.

(编辑:董宇)