

基于肠道菌群和脑-肠轴探讨益气健脾饮联合益生菌对腹泻型肠易激综合征小鼠的影响

曹昌霞¹, 张国铭², 王宏斌¹, 徐海珍¹, 王君¹, 杨如意^{1*}

(1. 青海大学附属医院, 青海 西宁 810001; 2. 青海大学, 青海 西宁 810016)

摘要: **目的** 考察益气健脾饮联合益生菌对腹泻型肠易激综合征小鼠肠道菌群和脑-肠轴的影响。**方法** 小鼠随机分为对照组、模型组、益气健脾饮组 (益气健脾饮 0.16 g/mL)、益生菌组 (2.1 mg/mL 双歧三联活菌肠溶胶囊)、联合用药组 (0.16 g/mL 益气健脾饮+2.1 mg/mL 双歧三联活菌肠溶胶囊), 每组 6 只。除对照组外, 其余各组小鼠采用番泻叶和不规律饮食建立腹泻型肠易激综合征模型, 然后给予相应药物干预, 对照组和模型组灌胃蒸馏水, 连续 14 d。给药结束后, 观察小鼠排便情况和体质量变化, 通过结肠扩张检测内脏敏感性, 旷场实验检测情感障碍。收集小鼠粪便、血清及结肠组织, HE 染色和 TUNEL 染色观察结肠组织病理损伤及细胞凋亡情况, ELISA 法检测血清 LPS、LDH、D-LA、SP、NK-1、5-HT、NPY 水平和结肠组织 5-HT、NPY 水平, RT-qPCR 法检测结肠组织 *Occludin*、*ZO-1*、*SP*、*NK-1* mRNA 表达, 16S RNA Illumina MiSeq/NovaSeq 测序平台分析结肠菌群丰度、结构。**结果** 与模型组比较, 联合用药组小鼠体质量升高 ($P<0.01$), 粪便 Bristol 评分和内脏敏感性降低 ($P<0.05$), 旷场实验中活动次数增加 ($P<0.01$); 结肠组织炎性细胞浸润减轻, 凋亡细胞占比降低 ($P<0.01$); 血清 LPS、LDH、D-LA、SP、NK-1、5-HT 水平和结肠组织 5-HT 水平、*NK-1*、*SP* mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 血清 NPY 水平和结肠组织 NPY 水平、*Occludin*、*ZO-1* mRNA 表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。联合用药组小鼠乳杆菌属丰度增加, 肠道菌群 α -多样性指数降低。Flavonoid biosynthesis (类黄酮生物合成) 是联合用药组和益气健脾饮组共同影响的差异通路。**结论** 益气健脾饮和益生菌联合使用具有协同作用, 能改善小鼠腹泻型肠易激综合征症状, 并可能通过改善肠道微生物群结构、肠道屏障损伤和肠-脑轴神经递质分泌来缓解腹泻疼痛和情感障碍。

关键词: 益气健脾饮; 益生菌; 腹泻型肠易激综合征; 肠道菌群; 脑-肠轴; 肠道黏膜屏障

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2024)10-3461-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.10.047

肠易激综合征是一种常见的慢性疾病, 全世界约有 11.2% 的人患该病^[1], 其特征是与排便相关的反复腹痛和 大便频率或形式的改变, 根据排便形式进一步分类可分为便秘型肠易激综合征、腹泻型肠易激综合征和混合排便型肠易激综合征^[2]。肠易激综合征患者经常会出现心理合并症 (例如焦虑和抑郁)^[3], 故抗抑郁已成为共识^[4-6], 美国胃肠病学会推荐使用三环类抗抑郁药和选择性 5-羟色胺 (5-HT) 再摄取抑制剂来改善肠易激综合征患者的整体症状。腹泻型肠易激综合征是肠易激综合征最常见的亚型 (占比 28%~46%), 饮食调整和益生菌可用于管理, 但仍然需要确定新的分子靶点和替代治疗^[7]。腹泻型肠易激综合征在中医中并没有病名记载, 但可以依据其临床症状归 于“泄泻”“腹痛”等范畴, 认为本病是外感六淫、内伤 七情、饮食不节所致, 脾虚湿盛是其基本病机, 因此, 腹 泻型肠易激综合征中医用药以健脾化湿药物为主^[8]。

虽然腹泻型肠易激综合征的病理生理学仍不清楚, 但 目前已经提出了几种可能机制, 包括胃肠道微生物群改变、 传染性胃炎、内脏超敏反应、肠-脑轴失调、慢性压力、 遗传因素等^[9-10]。有研究表明, 腹泻型肠易激综合征的发展 与肠功能障碍和肠上皮细胞通透性增加有关^[11-12]。益气 健脾饮具有健脾益气、和胃消食、行气止痛的作用, 在临 床上对腹泻有良好的治疗作用, 但其机制尚不清楚。因此, 本研究将以脾虚型腹泻型肠易激综合征小鼠为对象, 基于 肠道微生物群、肠道屏障和肠-脑轴, 探讨益气健脾饮对本 病的作用。

1 材料和方法

1.1 动物 健康雄性 SPF 级 ICR 小鼠 30 只 (动物质量合 格证号 51203500030761), 6 周龄, 体质量 (20.0±2.0) g, 购自成都达硕生物科技有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (川) 2020-030]。本研究经青海大学附属医院科研

收稿日期: 2023-09-28

基金项目: 2019 年青海中藏医药 (循证) 研究科研项目 (2019105)

作者简介: 曹昌霞 (1971—), 女, 硕士, 主任医师, 研究方向为中西医结合防治脾胃病。Tel: 15897082815, E-mail: 824443911@qq.com

* 通信作者: 杨如意 (1971—), 女, 硕士, 主任医师, 研究方向为中西医结合防治脾胃病。Tel: 13897240430, E-mail: yangruyi202110@163.com

伦理委员会批准（伦理号 P-SL-20190024），实验方案符合公平性、安全性原则，实验动物符合国家相关要求。

1.2 试剂与药物 番泻叶（批号 170909）购自苏州市春晖堂药业有限公司，经青海大学附属医院副主任中药师倪惠珍鉴定为正品，取 2 000 g，加 10 倍量蒸馏水浸泡 30 min，加 3 000 mL 蒸馏水煮沸后文火再煮 30 min，过滤，重复 1 次，合并 2 次滤液，浓缩成生药量 1 g/mL 的提取液。双歧三联活菌肠溶胶囊（批号 S19993065）购自晋城海斯制药有限公司。益气健脾饮由党参、黄芪、红景天、附子、干姜、白芍、柴胡、炒建神曲、炙甘草按一定比例组成，制成中药配方颗粒，购自华润三九医药股份有限公司。TUNEL 试剂盒（批号 49330900）购自瑞士 Roche 公司；脂多糖（LPS）、乳酸脱氢酶（LDH）、D-乳酸（D-LA）、5-羟色胺（5-HT）、神经肽 Y（NPY）ELISA 试剂盒（货号 Ek-M21141、Ek-M20796、Ek-M28014、Ek-M20360、EK-M20813）购自上海酶研生物科技有限公司；P 物质（SP）ELISA 试剂盒（货号 CSB-E08359m）购自武汉华美生物工程有限公司；神经激肽-1（NK-1）ELISA 试剂盒（货号 TW7607）购自上海通蔚生物工程有限公司。

1.3 分组及造模 小鼠适应性喂养 7 d 后，随机分为对照组、模型组、益气健脾饮组、益生菌组和联合用药组，每组 6 只，各组小鼠体质量组间无显著差异（ $P>0.05$ ）。除对照组外，其余各组小鼠灌胃 4 ℃ 番泻叶提取液（10 mL/kg），每天 2 次，连续 10 d，其间不时喂食、饮食无常，以期建立脾虚型腹泻型肠易激综合征模型。

1.4 给药 模型建立后，益气健脾饮组予以 0.16 g/mL 益气健脾饮混悬液，益生组予以 2.1 mg/mL 双歧三联活菌肠溶胶囊溶液，联合用药组予以 0.16 g/mL 益气健脾饮和 2.1 mg/mL 双歧三联活菌肠溶胶囊混合溶液，对照组和模型组予以蒸馏水，灌胃给药（0.1 mL/10 g），每天 1 次，连续 14 d。

1.5 指标检测

1.5.1 大便性状和体质量 记录小鼠体质量，观察其排便情况并进行 Bristol 评分，评分标准见表 1。

表 1 Bristol 评分标准

状态	类型	特征	分数/分
便秘	1 型	散在的硬团,难以排除	1
	2 型	表面凹凸的团块状	2
	3 型	表面干裂的肠状	3
正常	4 型	表面柔软的肠状	4
	5 型	软的团块	5
腹泻	6 型	糊状	6
	7 型	水样便	7

1.5.2 行为学检测 实验最后 1 天，将小鼠放进特制的透明塑料笼中固定，用胶布把导管和其尾部缠在一起，将润滑的乳胶球囊（长度 4.5 cm）组装到取栓导管后放入结肠中，并将导管另一头连接到装满水的注射器中，用于结肠扩张。待小鼠适应环境后，向球囊中逐渐注水扩张肠道，每次持续 20 s，分别观察腹部抬起、背部拱起容量阈值，

以评估内脏敏感性。

小鼠休息 1 h 后进行旷场实验，置于 40 cm×40 cm×30 cm 箱中，2 min 后记录水平、垂直活动次数，观察 5 min 内活动情况。每测完 1 只小鼠后，用 75% 乙醇清洁该区域清洁笼子，再进行下一次测试。完成所有行为学检测后，3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠，腹主动脉采血，处死，采集结肠组织和内容物。

1.5.3 结肠组织 HE 染色 将结肠组织用 4% 多聚甲醛固定后石蜡包埋，脱水，切片，苏木精染色 10~20 min，伊红染色 3~5 min，封片后通过 BA210 Digital 数码三目摄影显微镜观察病理形态变化。

1.5.4 结肠组织 TUNEL 染色 按照 TUNEL 试剂盒说明书操作，组织切片脱蜡至水，柠檬酸微波修复，将切片与 TUNEL 反应液在 37 ℃ 黑暗环境中孵育 60 min，PBS 清洗 3 次，每次 5 min，DAPI 染核 15 min，采用 Pannoramic 250 数字切片扫描仪进行扫描，然后采集图像，凋亡细胞核显示绿色，正常细胞核显示蓝色。

1.5.5 血清或结肠组织 LPS、LDH、D-LA、5-HT、NPY、SP、NK-1 水平检测 采用 ELISA 试剂盒检测 LPS、LDH、D-LA、5-HT、NPY、SP、NK-1 在血清或结肠组织中的水平，严格按照说明书进行，通过酶标仪检测 450 nm 波长处吸光度。

1.5.6 RT-qPCR 法检测结肠组织 *Occludin*、*ZO-1*、*SP*、*NK-1* mRNA 表达 采用 TRIzol 法提取结肠组织中的总 RNA，分光光度计测定其浓度和纯度，按照反转录试剂盒说明书反转录为 cDNA，进行 PCR 扩增反应。以 β -actin 为内参， $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 *Occludin*、*ZO-1*、*SP*、*NK-1* mRNA 表达，引物序列见表 2。

表 2 引物序列

基因	引物序列
<i>SP</i>	正向 5'-AGCCAGGGGTTACATCTGTG-3'
	反向 5'-TACAGACAGCCTCGACATGTG-3'
<i>NK-1</i>	正向 5'-CCACAAGAGAATGAGGACAGTG-3'
	反向 5'-CATACCCAATCACCAGCAGAG-3'
<i>Occludin</i>	正向 5'-ATCTGGGCTTTTCTTTAATCATC-3'
	反向 5'-GGGCTCTTCATCATAAATGTCTT-3
<i>ZO-1</i>	正向 5'-ACCGAAACCTCTCTATGCTC-3'
	反向 5'-ATCATTTCCACCAGCTACTCG-3'
β -actin	正向 5'-GAAGATCAAGATCATTGCTCC-3'
	反向 5'-TACTCTGCTGTGCTGATCCA-3'

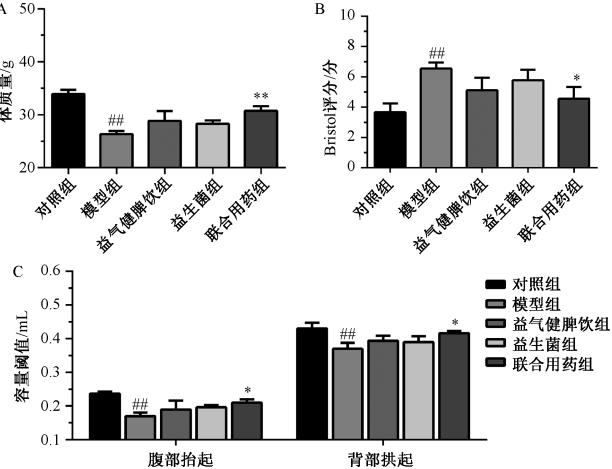
1.5.7 高通量测序 将采集的粪便置于液氮中保存，送至上海派诺森生物科技有限公司，采用 Illumina MiSeq/ NovaSeq 平台对群落 DNA 片段进行双端（Paired-end）测序，序列经去噪处理后使用 QIIME2（2019.4）软件进行物种分类学注释，接着进行 ASV/OTU 表抽平。数据分析包括（1）通过对抽平后的 ASV/OTU 表格进行统计，获得肠道菌群在门和属水平上的组成表；（2）使用未抽平的 ASV/OTU 表对深度进行抽平，以最大抽平深度时的得分计算 alpha 多样性指数；（3）使用生物代谢通路分析数据库

(KEGG, <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) 预测肠道菌群富集的潜在通路。

1.6 统计学分析 通过 GraphPad Prism 8 软件进行处理, 结果以 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 2 组间比较采用非配对 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

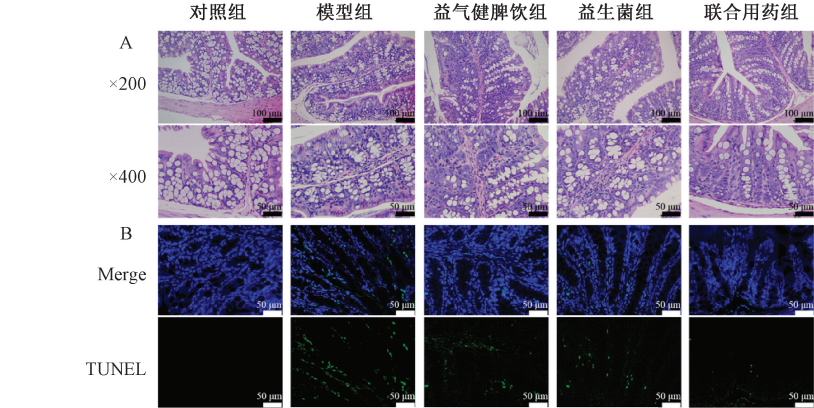
2 结果

2.1 益气健脾饮联合益生菌对腹泻型肠易激综合征小鼠表征的影响 与对照组比较, 模型组小鼠体质量降低 ($P<0.01$), 粪便 Bristol 评分升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 益气健脾饮组和益生菌组小鼠体质量和粪便 Bristol 评分无明显变化 ($P>0.05$), 而联合用药组小鼠体质量升高 ($P<0.01$), 粪便 Bristol 评分降低 ($P<0.05$), 见图 1A~1B。与对照组比较, 模型组小鼠腹部抬起值和背部拱起值降低 ($P<0.01$), 表明内脏敏感性升高; 与模型组比较, 益气健脾饮组和益生菌组小鼠腹部抬起值和背部拱起值无明显变化 ($P>0.05$), 而联合用药组小鼠腹部抬起值和背部拱起值升高 ($P<0.05$), 表明内脏敏感性降低, 见图 1C。



注: 与对照组比较, ## $P<0.01$; 与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

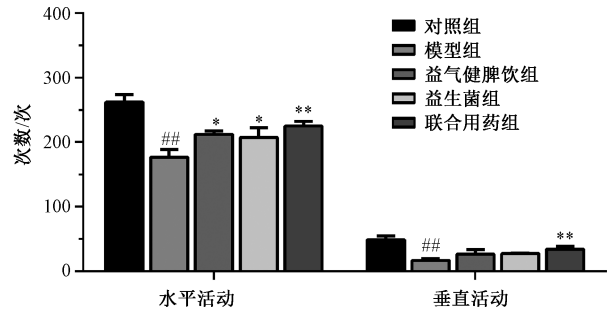
图 1 益气健脾饮联合益生菌对腹泻型肠易激综合征小鼠表征的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)



注: A 为小鼠结肠组织 HE 染色, B 为小鼠结肠组织 TUNEL 染色, C 为小鼠结肠凋亡细胞占比。与对照组比较, ## $P<0.01$; 与模型组比较, ** $P<0.01$; 与联合用药组比较, && $P<0.01$ 。

图 3 益气健脾饮联合益生菌对腹泻型肠易激综合征小鼠结肠组织损伤的影响

2.2 益气健脾饮联合益生菌对腹泻型肠易激综合征小鼠情感障碍的影响 如图 2 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠水平活动次数和垂直活动次数降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 益气健脾饮组和益生菌组小鼠水平活动次数升高 ($P<0.05$), 垂直活动次数无明显变化 ($P>0.05$), 而联合用药组小鼠水平活动次数和垂直活动次数升高 ($P<0.01$)。

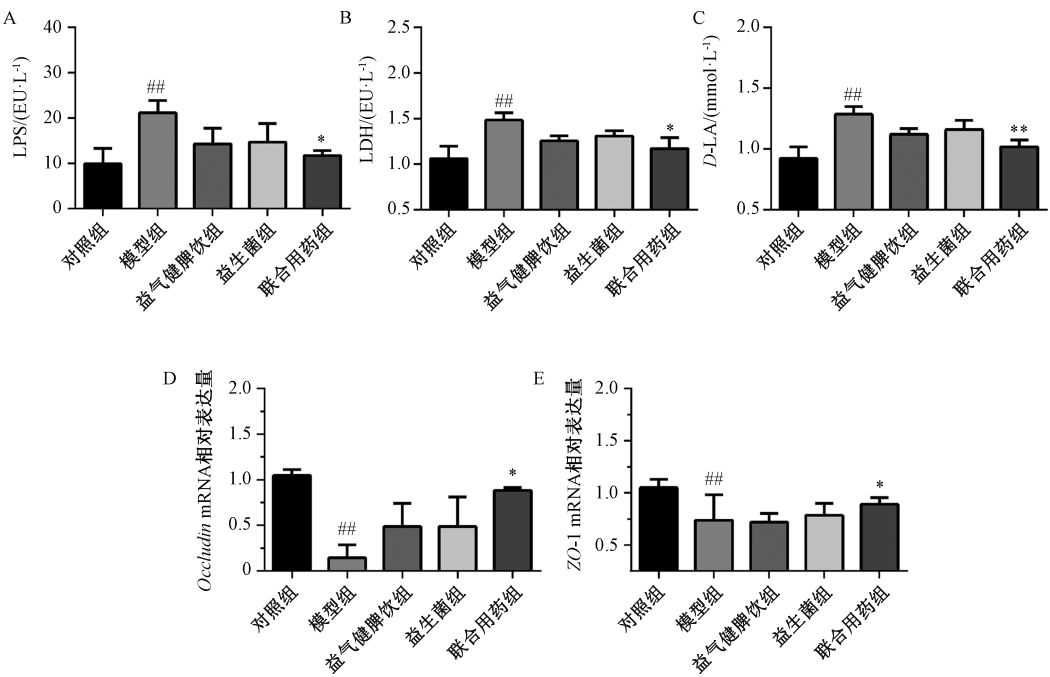


注: 与对照组比较, ## $P<0.01$; 与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 2 益气健脾饮联合益生菌对腹泻型肠易激综合征小鼠旷场实验活动次数的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

2.3 益气健脾饮联合益生菌对腹泻型肠易激综合征小鼠结肠组织损伤的影响 如图 3 所示, 对照组小鼠结肠组织结构完整, 黏膜层、黏膜下层、肌层和外膜分层明显, 未见明显病理改变和细胞凋亡; 与对照组比较, 模型组小鼠结肠黏膜固有层出现大量炎性细胞聚集, 以淋巴细胞和中性粒细胞为主, 且结肠组织细胞发生凋亡, 凋亡细胞占比升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 益气健脾饮组、益生菌组及联合用药组小鼠结肠黏膜组织炎性细胞浸润减轻, 凋亡细胞占比降低 ($P<0.01$), 且联合用药组作用更佳 ($P<0.01$)。

2.4 益气健脾饮联合益生菌对腹泻型肠易激综合征小鼠肠道屏障的影响 如图 4A~4C 所示, 与对照组比较, 模型组血清 LPS、LDH、D-LA 水平升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 益气健脾饮组和益生菌组血清 LPS、LDH、D-LA 水平



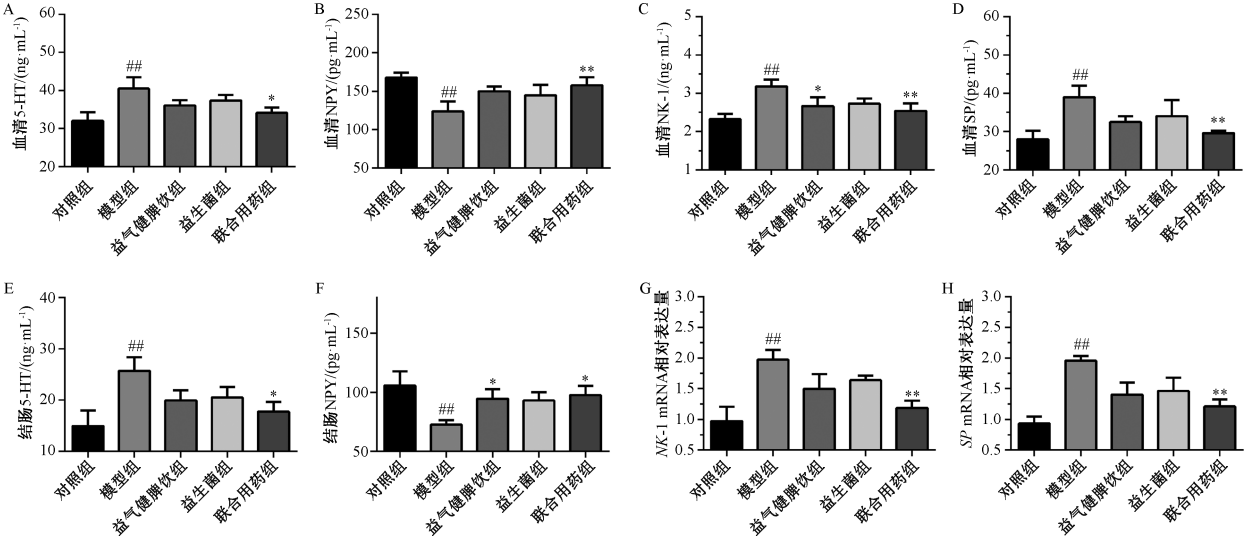
注：与对照组比较，^{##}*P*<0.01；与模型组比较，^{*}*P*<0.05，^{**}*P*<0.01。

图 4 益气健脾饮联合益生菌对腹泻型肠易激综合征小鼠肠道屏障的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=6)

无明显变化 (*P*>0.05)，而联合用药组血清 LPS、LDH、D-LA 水平降低 (*P*<0.05, *P*<0.01)。如图 4D~4E 所示，与对照组比较，模型组结肠组织 *Occludin*、*ZO-1* mRNA 表达降低 (*P*<0.01)；与模型组比较，益气健脾饮组和益生菌组结肠组织 *Occludin*、*ZO-1* mRNA 表达无明显变化 (*P*>0.05)，而联合用药组结肠组织 *Occludin*、*ZO-1* mRNA 表达升高 (*P*<0.05)。

2.5 益气健脾饮联合益生菌对腹泻型肠易激综合征小鼠

脑-肠轴相关因子分泌的影响 如图 5 所示，与对照组比较，模型组血清和结肠组织 5-HT 水平升高 (*P*<0.01)，NPY 水平降低 (*P*<0.01)，血清 NK-1、SP 水平和结肠组织 NK-1、SP mRNA 表达升高 (*P*<0.01)；与模型组比较，联合用药组血清和结肠组织 5-HT 水平降低 (*P*<0.01)，NPY 水平升高 (*P*<0.05, *P*<0.01)，血清 NK-1、SP 水平和结肠组织 NK-1、SP mRNA 表达降低 (*P*<0.01)。



注：A~D 分别为小鼠血清 5-HT、NPY、NK-1、SP 水平，E~F 分别为小鼠结肠组织 5-HT、NPY 水平，G~H 分别为小鼠结肠组织 NK-1、SP mRNA 表达。与对照组比较，^{##}*P*<0.01；与模型组比较，^{*}*P*<0.05，^{**}*P*<0.01。

图 5 益气健脾饮联合益生菌对腹泻型肠易激综合征小鼠脑-肠轴相关因子分泌的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=6)

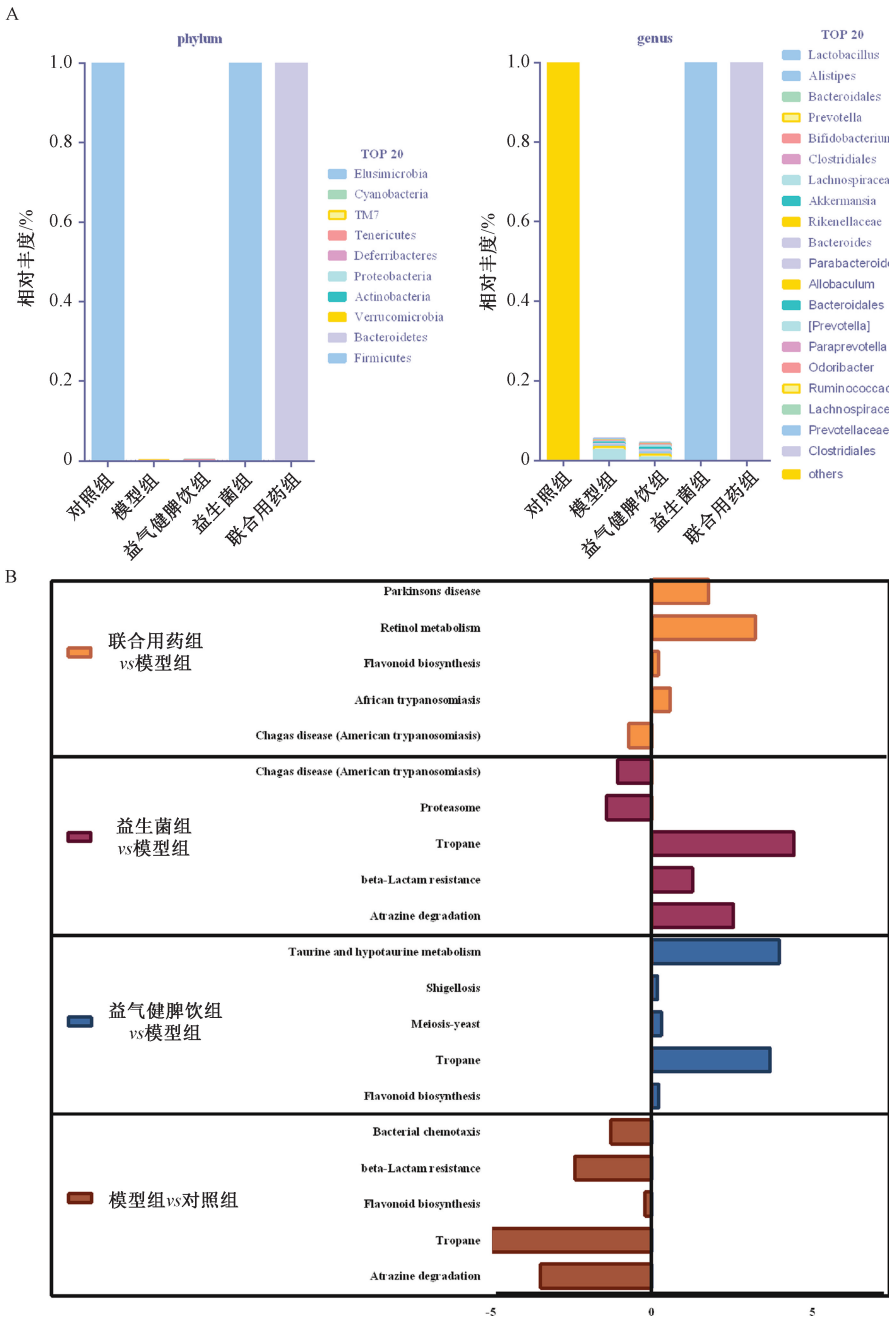
2.6 益气健脾饮联合益生菌对腹泻型肠易激综合征小鼠肠道菌群的影响 如图 6A 所示，在门水平上，与对照组比

较，模型组 *Firmicutes* (厚壁菌门) 相对平均丰度降低，*Bacteroidetes* (拟杆菌门) 相对平均丰度升高；与模型组比

较，益气健脾饮组、益生菌组及联合用药组 *Firmicutes* 相对平均丰度增加，*Bacteroidetes* 相对平均丰度降低，其中联合用药组优于益气健脾饮组和益生菌组。在属水平上，与对照组比较，模型组 *Lactobacillus*（乳杆菌属）相对平均丰度降低；与模型组比较，益气健脾饮组、益生菌组及联合用药组 *Lactobacillus* 相对平均丰度增加，其中联合用药组优于益气健脾饮组和益生菌组。

如图 6B 所示，与对照组比较，模型组肠道菌群降低了在 Atrazine degradation（阿特拉津降解产物）、Tropane，piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis（莨菪碱、哌啶和

吡啶生物碱的生物合成）、Flavonoid biosynthesis（类黄酮生物合成）、beta-Lactam resistance（内酰胺抗药性）和 Bacterial chemotaxis（细菌趋药性）5 个通路中的富集；与模型组比较，益气健脾饮组增加了肠道菌群在 Flavonoid biosynthesis、Tropane，piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis 通路的富集，益生菌组增加了肠道菌群在 Atrazine degradation、beta-Lactam resistance、Tropane，piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis 通路的富集，而益气健脾饮和益生菌联合组增加了肠道菌群在 Flavonoid biosynthesis 通路的富集。



注：A 为门、属水平上前 20 位肠道菌群，B 为组间 KEGG 差异通路分析（横轴为 logFC 值，正值代表上调，负值代表下调）。

图 6 益气健脾饮联合益生菌对腹泻型肠易激综合征小鼠肠道菌群的影响（n=6）

如表 3 所示，与对照组比较，模型组 Chao1、Simpson、Shannon、Pielou_e、Observed_species、Faith_pd 有升高趋势，Goods_coverage 有降低趋势，但无显著性差异 ($P>0.05$)；与模型组比较，联合用药组 Chao1、Simpson、

Shannon、Pielou_e、Observed_species、Faith_pd 有降低趋势，Goods_coverage 有升高趋势，但无显著性差异 ($P>0.05$)。

表 3 各组肠道菌群 Alpha 多样性指数比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	Chao1	Simpson	Shannon	Pielou_e	Observed_species	Faith_pd	Goods_coverage
对照组	735.62±92.35	0.95±0.01	6.71±0.29	0.73±0.03	611.57±58.71	30.36±3.06	0.97±0.01
模型组	1163.79±402.12	0.96±0.04	7.42±0.91	0.76±0.07	885.97±237.18	37.03±5.24	0.94±0.02
益气健脾饮	725.75±336.82	0.97±0.02	7.20±1.11	0.78±0.05	643.17±299.46	31.64±12.79	0.97±0.01
益生菌	1083.06±163.01	0.97±0.02	7.50±0.75	0.77±0.05	842.57±184.92	36.97±4.23	0.95±0.01
联合用药组	739.03±228.22	0.95±0.03	6.61±0.73	0.72±0.05	576.47±149.96	32.07±5.79	0.97±0.01

3 讨论

本研究评估了益气健脾饮和益生菌单独使用及其联合使用对腹泻型肠易激综合征小鼠症状的改善作用，并分析了可能机制。结果表明，益气健脾饮和益生菌联合使用对腹泻型肠易激综合征小鼠腹泻、腹痛及情感障碍的改善作用优于单独用药组。

肠黏膜屏障是由肠上皮细胞和紧密连接组成的，对于营养吸收、抵御病原体 and 维持肠道稳态至关重要^[13-14]，多项研究表明，黏膜屏障功能的改变与腹泻型肠易激综合征在内的多种肠道疾病有关^[15-16]。本研究发现，益气健脾饮和益生菌联合使用能提高腹泻型肠易激综合征小鼠结肠组织 Occludin、ZO-1 mRNA 表达，并减轻结肠组织炎性细胞浸润和肠细胞凋亡，表明益气健脾饮和益生菌联合使用改善了腹泻型肠易激综合征小鼠肠道黏膜屏障，且作用优于单独用药组。

目前广泛认为，肠易激综合征中的低度炎症会导致局部神经纤维敏化^[17]，进而导致中枢敏化^[18]，因此，肠易激综合征（与其他功能性胃肠道疾病一样）被认为是一种脑-肠轴疾病^[19-20]。大量研究表明，肠易激综合征模型大鼠内脏敏化和情绪障碍与神经递质 5-HT、NPY、SP、NK-1 的异常表达相关，在腹泻型肠易激综合征中，5-HT、SP、NK-1 表达的提高促进了肠蠕动，并提高了疼痛刺激的敏感性^[21-22]。本研究发现，益气健脾饮和益生菌联合使用可以降低 5-HT、SP、NK-1 水平，提高 NPY 水平，表明益气健脾饮和益生菌联合使用改善了腹泻型肠易激综合征小鼠脑-肠轴神经递质分泌，从而降低了腹泻型肠易激综合征敏感性和情感障碍，且作用优于单独用药组。

肠道菌群失调也是腹泻型肠易激综合征的可能机制之一^[23]。研究表明，肠道微生态失调可破坏肠黏膜屏障功能，使肠道通透性增高，发生免疫紊乱，从而让神经内分泌和应激行为更加敏感^[8,24]；腹泻型肠易激综合征患者肠道菌群中厚壁菌门占比降低，拟杆菌门占比增加^[25-26]。本研究发现，腹泻型肠易激综合征小鼠肠道菌群也发生了同样的改变，而益气健脾饮和益生菌联合使用增加了腹泻型肠易激综合征小鼠厚壁菌门平均相对丰度，降低了拟杆菌门平均相对丰度。乳酸杆菌一直是肠道微生态的研究重点，常用作益生菌用于维持稳定的肠道微生态^[27]，在腹泻

型肠易激综合征患者中，乳杆菌属相对丰度降低^[25]，且大量研究表明，乳酸杆菌用于治疗腹泻型肠易激综合征可以通过调整肠道菌群结构改善腹泻型肠易激综合征症状^[28-30]，提示乳酸杆菌属相对丰度可能是腹泻型肠易激综合征的治疗靶点。本研究结果显示，益气健脾饮和益生菌联合使用增加了腹泻型肠易激综合征小鼠乳杆菌属相对丰度，说明两者联用可通过增加乳杆菌属相对丰度来改善肠道菌群结构，从而改善症状。此外，本研究还分析了益气健脾饮和益生菌联合使用对腹泻型肠易激综合征小鼠肠道菌群多样性改变，结果表明两者联用降低了肠道菌群 α 多样性。

KEGG 通路分析发现，腹泻型肠易激综合征小鼠肠道菌群降低了在 Atrazine degradation、Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis、Flavonoid biosynthesis、beta-Lactam resistance、Bacterial chemotaxis 通路的富集，而益气健脾饮增加了在 Flavonoid biosynthesis、Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis 通路的富集，益生菌增加了在 Atrazine degradation、beta-Lactam resistance、Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis 通路的富集，益气健脾饮和益生菌联合使用增加了在 Flavonoid biosynthesis 的富集。类黄酮具有许多药用价值，包括抗癌、抗氧化、抗炎、抗病毒，还具有神经保护、心脏保护作用，这些生物活性取决于其类型、作用方式及生物利用度^[31]。本研究中益生菌可能通过增加益气健脾饮中类黄酮的生物利用度来提高益气健脾饮对腹泻型肠易激综合征的改善作用，但样本量较少，需要进一步验证。

综上所述，益气健脾饮和益生菌联合使用具有协同作用，能改善小鼠腹泻型肠易激综合征症状，可能通过调节肠道微生物群结构、肠道屏障损伤和肠-脑轴神经递质分泌来改善腹泻疼痛和情感障碍。此外，益气健脾饮和益生菌对腹泻型肠易激综合征的协同作用可能与肠道菌群功能在 Flavonoid biosynthesis 通路上的富集相关。

参考文献：

[1] Ebeid B, Eid R A, Attia D, *et al.* Prevalence of microscopic colitis in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome patients: Cohort study from Upper Egypt[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2022, 56(3): e232-e238.

[2] Oh S J, Takakura W, Rezaie A. Shortcomings of trials assessing antidepressants in the management of irritable bowel syndrome: A critical review[J]. *J Clin Med*, 2020, 9(9): 2933.

[3] Lee C, Doo E, Choi J M, et al. The increased level of depression and anxiety in irritable bowel syndrome patients compared with healthy controls: Systematic review and meta-analysis [J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2017, 23 (3) : 349-362.

[4] Ford A C, Moayyedi P, Chey W D, et al. American college of gastroenterology monograph on management of irritable bowel syndrome[J]. *Am J Gastroenterol*, 2018, 113(Suppl 2): 1-18.

[5] Weinberg D S, Smalley W, Heidelbaugh J J, et al. American Gastroenterological Association Institute Guideline on the pharmacological management of irritable bowel syndrome [J]. *Gastroenterology*, 2014, 147(5): 1146-1148.

[6] 王子惠, 韩嘉伦, 辛海威, 等. 应用抗抑郁药治疗肠易激综合征的研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(23): 3146-3148.

[7] Lacy B E. Diagnosis and treatment of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome[J]. *Int J Gen Med*, 2016, 9: 7-17.

[8] 连秋华, 朱惠萍, 梁国强, 等. 健脾合剂对脾虚腹泄型肠易激综合征小鼠肠道菌群的干预研究[J]. 世界科学技术 (中医药现代化), 2020, 22(3): 770-780.

[9] Abdalla M I, Sandler R S, Kappelman M D, et al. Prevalence and impact of inflammatory bowel disease-irritable bowel syndrome on patient-reported outcomes in CCFA partners [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2017, 23(2): 325-331.

[10] Ford A C, Lacy B E, Talley N J. Irritable bowel syndrome[J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(26) : 2566-2578.

[11] Ghoshal U C, Shukla R, Ghoshal U, et al. The gut microbiota and irritable bowel syndrome: friend or foe? [J]. *Int J Inflam*, 2012, 2012: 151085.

[12] Ortiz-Lucas M, Saz-Peiró P, Sebastián-Domingo J J. Irritable bowel syndrome immune hypothesis. Part two; the role of cytokines[J]. *Rev Esp Enferm Dig*, 2010, 102(12) : 711-717.

[13] Hou Q, Zhu S, Zhang C, et al. Berberine improves intestinal epithelial tight junctions by upregulating A20 expression in IBS-D mice[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109206.

[14] Sánchez de Medina F, Romero-Calvo I, Mascaraque C, et al. Intestinal inflammation and mucosal barrier function [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2014, 20(12) : 2394-2404.

[15] Kolodziej L E, Lodolce J P, Chang J E, et al. TNFAIP3 maintains intestinal barrier function and supports epithelial cell tight junctions[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10) : e26352.

[16] Dunlop S P, Hebden J, Campbell E, et al. Abnormal intestinal permeability in subgroups of diarrhea-predominant irritable bowel syndromes[J]. *Am J Gastroenterol*, 2006, 101(6) : 1288-1294.

[17] Ng Q X, Soh A Y S, Loke W, et al. The role of inflammation in irritable bowel syndrome (IBS) [J]. *J Inflamm Res*, 2018, 11: 345-349.

[18] Verne G N, Price D D. Irritable bowel syndrome as a common precipitant of central sensitization [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2002, 4(4) : 322-328.

[19] Casado-Bedmar M, Keita Å V. Potential neuro-immune therapeutic targets in irritable bowel syndrome[J]. *Therap Adv Gastroenterol*, 2020, 13: 1756284820910630.

[20] Labanski A, Langhorst J, Engler H, et al. Stress and the brain-gut axis in functional and chronic-inflammatory gastrointestinal diseases: A transdisciplinary challenge [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2020, 111: 104501.

[21] 杨 帅. 电针对 IBS 模型大鼠内脏敏感性与情绪心理调节的机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.

[22] 杨焱麟, 陈 敏, 周彦妮, 等. P 物质与肝郁脾虚型腹泻型肠易激综合征关系及中医药调控的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(9) : 82-85.

[23] Wei W, Wang H F, Zhang Y, et al. Altered metabolism of bile acids correlates with clinical parameters and the gut microbiota in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome[J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(45) : 7153-7172.

[24] 马端阳. 基于肠-脑轴探究四磨汤对肝郁脾虚型抑郁症的抑制作用及机制研究 [D]. 保定: 河北大学, 2020.

[25] Zhuang X, Tian Z, Li L, et al. Fecal microbiota alterations associated with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1600.

[26] Wang Z, Xu C M, Liu Y X, et al. Characteristic dysbiosis of gut microbiota of Chinese patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome by an insight into the pan-microbiome[J]. *Chin Med J*, 2019, 132(8) : 889-904.

[27] Altomare A, Di Rosa C, Imperia E, et al. Diarrhea predominant-irritable bowel syndrome (IBS-D) : Effects of different nutritional patterns on intestinal dysbiosis and symptoms [J]. *Nutrients*, 2021, 13(5) : 1506.

[28] Preston K, Krumian R, Hattner J, et al. *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *Lactobacillus casei* LBC80R and *Lactobacillus rhamnosus* CLR2 improve quality-of-life and IBS symptoms: a double-blind, randomised, placebo-controlled study[J]. *Benef Microbes*, 2018, 9(5) : 697-706.

[29] Bonfrate L, Di Palo D M, Celano G, et al. Effects of *Bifidobacterium longum* BB536 and *Lactobacillus rhamnosus* HN001 in IBS patients[J]. *Eur J Clin Invest*, 2020, 50(3) : e13201.

[30] Kim J, Cho K, Kim J S, et al. Probiotic treatment induced change of inflammation related metabolites in IBS-D patients/ double-blind, randomized, placebo-controlled trial[J]. *Food Sci Biotechnol*, 2020, 29(6) : 837-844.

[31] Ullah A, Munir S, Badshah S L, et al. Important flavonoids and their role as a therapeutic agent [J]. *Molecules*, 2020, 25(22) : 5243.