

从肠道菌群探讨二陈汤和参苓白术散“同病异治” 肥胖2型糖尿病

张栎婧¹, 赵田¹, 杭天怡¹, 周雯¹, 战丽彬^{2,3}

(1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023; 2. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110847;
3. 辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室, 辽宁 沈阳 110847)

摘要:目的 观察二陈汤和参苓白术散对肥胖2型糖尿病大鼠肠道菌群的影响, 探索“同病异治”的科学内涵。方法 5周龄雄性糖尿病型大鼠(zucker diabetic fatty, ZDF)大鼠随机分为模型组、二陈汤组和参苓白术散组, 其同窝瘦型为对照组。二陈汤组和参苓白术散组每日分别予以4.58 g/kg和24 g/kg对应方剂灌胃干预, 余组予等量超纯水, 共4周。对大鼠结肠内容物进行16S rRNA测序并分析。结果 二陈汤和参苓白术散可以共同升高的菌属为*Lactobacillus*、*Blautia*、*Dorea*, 而其调控的不同之处在于二陈汤可以降低*Holdemania*、*Ruminococcus*、*Atopostipes*等7种菌属丰度, 同时增加*Blautia*、*Clostridium*、*Lactobacillus*等20种菌属丰度, 而参苓白术散则可以降低*Allobaculum*、*Eubacterium*、*Coprococcus*等7种菌属丰度以改善糖脂代谢紊乱, 延缓肥胖2型糖尿病的发生发展。其功能富集显示明显异同。结论 二陈汤和参苓白术散可以通过调节ZDF大鼠肠道菌群来改善肥胖2型糖尿病, 生物靶标的差异反映了两方剂中医功效的区别, 为“同病异治”的中医理论生物学基础作出初步探索。

关键词: 肥胖2型糖尿病; 二陈汤; 参苓白术散; 肠道菌群

中图分类号: R255.4, R587.1

文献标志码: A

文章编号: 2097-5031(2024)01-0017-09

Discussion on "Treating the Same Disease with Different Methods"—Mechanism of Erchen Decoction (二陈汤) and Shenling Baizhu Powder (参苓白术散) in the Treatment of Obese Type 2 Diabetes from the Intestinal Flora

ZHANG Lijing¹, ZHAO Tian¹, HANG Tianyi¹, ZHOU Wen¹, ZHAN Libin^{2,3}

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, Jiangsu, China; 2. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, Liaoning, China; 3. Key Laboratory of Ministry of Education for TCM Viscera-State Theory and Applications, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, Liaoning, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of Erchen Decoction and Shenling Baizhu Powder on intestinal flora of obese type 2 diabetes rats, and explore the scientific connotation of "treating the same disease differently". **Methods** 5-week-old male ZDF rats were randomly divided into a model group, a Erchen Decoction group, and a Shenling Baizhu Powder group, with the same litter lean type as the control group. The Erchen Decoction group and the Shenling Baizhu Powder group were given daily gavage interventions of 4.58 g/kg and 24 g/kg corresponding formulas, respectively. The remaining groups were given equal amounts of ultrapure water for a total of 4 weeks. Perform 16S rRNA sequencing and analysis on the contents of the cecum in rats. **Results** Erchen Decoction and Shenling Baizhu Powder can jointly increase the bacteria genera including *Lactobacillus*, *Blautia* and *Dorea*. The difference in their regulation is that Erchen Decoction can reduce the abundance of 7 bacteria genera including *Holdemania*, *Ruminococcus* and *Atopostipes*, and increase the abundance of 20 bacteria genera including *Blautia*, *Clostridium* and *Lactobacillus*, while Shenling Baizhu Powder can reduce the abundance of 7 bacteria genera including *Allobaculum*, *Eubacterium* and *Coprococcus* to improve the disorder of glucose and lipid metabolism and delay the occurrence of obesity type 2 diabetes development. Their functional enrichment displays obvious similarities and differences. **Conclusion** Erchen Decoction and Shenling Baizhu Powder can improve obesity type 2 diabetes by regulating the intestinal flora of ZDF rats. The difference in biological targets reflects the difference in the efficacy of traditional Chinese medicine between the two prescriptions, which makes a preliminary exploration of the biological basis of the traditional

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(81730111); 国家中医药管理局国家中医药领军人才岐黄学者支持项目(国中医药人教函〔2022〕6号); 辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室开放基金项目(zyzx2106)

作者简介: 张栎婧(1993-), 女, 江苏南京人, 讲师, 博士, 研究方向: 脾脏象理论在中医药防治代谢性疾病中的应用。

通讯作者: 战丽彬(1964-), 女, 辽宁大连人, 教授, 博士研究生导师, 博士, 研究方向: 脾脏象理论及其应用的现代研究。

E-mail: zllibin2021@163.com。

引用格式: 张栎婧, 赵田, 杭天怡, 等. 从肠道菌群探讨二陈汤和参苓白术散“同病异治”肥胖2型糖尿病[J]. 中西医结合慢性病杂志, 2024, 1(1):

Chinese medicine theory of "treating the same disease differently".

Keywords: obesity type 2 diabetes; Erchen Decoction (二陈汤); Shenling Baizhu Powder (参苓白术散); gut microbiota

“同病异治”是指虽然疾病相同,但由于疾病的发展过程、具体证型、患者的身体机能等的不同,具体的治疗方法也有所不同^[1]。“病同而证异,证异则方异”,充分体现中医学审证求因、辨证施治的准则^[2]。

肥胖2型糖尿病的发病率正在逐年升高,预防和治疗肥胖2型糖尿病已成为全世界关注的课题。中医认为肥胖是2型糖尿病的发病基础,痰湿是肥胖2型糖尿病的重要病理因素。减少体内水湿积聚,延缓肥胖2型糖尿病发展的疾病进程,是防治肥胖2型糖尿病的重要原则。二陈汤和参苓白术散均出自宋代《太平惠民和剂局方》,二陈汤者“治痰饮为患,或呕吐恶心,或头眩心悸,或中脘不快,或发为寒热,或因食生冷,脾胃不和”,为治湿痰之主方,主在燥湿化痰;而参苓白术散“治脾胃虚弱,饮食不进,多困少力,中满痞噎,心忪气喘,呕吐泄泻及伤中和不热,久服养气育神,醒脾悦色,顺正辟邪”,重在健脾益气以祛湿。课题组前期研究证实二者都可通过祛除体内水湿积聚对肥胖2型糖尿病产生干预作用,在糖脂代谢表现、胰岛素抵抗的改善中有明显益处^[3-4]。现代研究显示肠道菌群在肥胖2型糖尿病的发生发展中具有重要地位,二陈汤和参苓白术散都可以调节肥胖2型糖尿病大鼠的肠道菌群紊乱,与疾病的改善有关。但是二者对肠道菌群的影响有何异同,其与疾病发生的中医病机的关系有何异同尚不明确。本研究通过16S核糖体RNA基因测序(16S rRNA)技术对二陈汤和参苓白术散干预的肥胖2型糖尿病大鼠的肠内容物进行测序,观察双方从祛痰化湿和健脾祛湿的角度分别从实虚论治,调节肠道菌群结构和功能的差异,改善肥胖,延缓2型糖尿病的发生发展,初步探索中医对肥胖2型糖尿病同病异治的生物学基础,挖掘潜在的生物靶标,为相关研究提供思路。

1 材料与方法

1.1 动物

糖尿病型大鼠(zucker diabetic fatty, ZDF)36只,体质量(130±10)g,瘦型对照16只,体质量(100±10)g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供[动物质量合格证号:SCXK(京)2016-0006]。动物实验均经南京中医药大学动物伦理委员会批准(批准号:201901A009)。

1.2 设备

NanoDrop ND-1000分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific公司), Microplate reader FLx800(美国 BioTek公司), Bioanalyzer(美国 Agilent公司), QuantiFluor 荧光定量系统(美国 Promega公司), MiSeq PE300 测序仪(美国 Illumina公司)。

1.3 方法

1.3.1 药物制备

二陈汤和参苓白术散药物组成中除生姜(鲜)外,其余药材均于南通三越中药饮片有限公司购入,根据《中华人民共和国药典》(2015版)方法分别制备。见表1。将方中药物以8倍重量/体积(1:8, W/V)置于超纯水中浸泡2 h,煮沸后文火再煎30 min,合并2次萃取的滤液并浓缩,二陈汤的最终生药含量为4.58 g/kg,参苓白术散的最终生药含量为24 g/kg。4℃条件下保存备用。

1.3.2 动物实验

所有大鼠于南京中医药大学洁净动物级(specific pathogen free, SPF)动物实验中心饲养,温度(24±2)℃,湿度(65±5)% ,12 h/12 h光照-黑暗循环,自由摄食、饮水。适应性喂养后,随机分为模型组(记为Z组,18只)、二陈汤组(记为E组,8只)和参苓白术散组(记为S组,10只),其同窝瘦型为对照组(记为L组,16只)。L组饲喂购自中

表1 二陈汤和参苓白术散药物组成

二陈汤			参苓白术散		
药味	剂量	产地及批号	药味	剂量/g	产地及批号
陈皮	15 g	浙江 181218	人参	15	吉林 180111
法半夏	15 g	江苏 181207	茯苓	15	安徽 171213
茯苓	9 g	安徽 190217	麸炒白术	15	浙江 171127
炙甘草	4.5 g	甘肃 181211	生山药	15	河南 171207
乌梅	1个	福建 180325	炒白扁豆	12	浙江 171214
生姜	7片(每片约3 cm × 2 cm × 0.2 cm)	江苏	莲子肉	9	湖南 171118
			炒薏苡仁	9	贵州 171207
			桔梗	6	广东 171110
			阳春砂	6	安徽 171214
			炙甘草	9	内蒙古 171127

国Mediscience的普通饲料(MD17121),其余各组大鼠饲喂购自美国Labdiet配方诱导饲料(Purina #5008)。由于ZDF大鼠瘦素受体基因突变,表现为先天的肥胖,经诱导饲料诱导后出现稳定的高血糖症状,是肥胖2型糖尿病的理想模型。

课题组前期已经证实4.58 g/kg和24 g/kg分别为二陈汤^[3]和参苓白术散^[4]的最佳药效剂量,E组和S组1 mL/(100 g·d)体质量灌胃相应剂量的中药,L组和Z组每天灌胃等体积超纯水,共计4周。末次给药后,异氟烷麻醉大鼠,取大鼠结盲肠内容物,-80℃保存。

1.3.3 菌群测序及序列分析

从样本中提取微生物总脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA),检测DNA提取数量和质量。对16S rRNA基因V3-V4区进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增,采用Illumina平台对DNA片段进行双端测序。按照DADA2分析流程进行去引物,质量过滤,去噪,拼接和去嵌合体,产生的每个去重的序列称为扩增子序列变体(amplicon sequence variants, ASVs)。

1.3.4 生物信息学分析

肠道菌群数据分析流程在QIIME2 (<https://docs.qiime2.org/2020.8/>)和R语言ggplot2包软件中进行。根据ASVs在组间的分布,评估各组5周和9周龄时的Simpson指数用以表征 α 多样性水平,使用R脚本绘制箱线图。使用基于未加权的UniFrac距离的主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA),以衡量各组间5周和9周龄时的 β 多样性差异,使用R脚本绘制PCoA的样本二维排序图,并通过Adonis分析评价差异显著性。通过韦恩图展示各组间共有及特有ASVs个数。在物种分类学组成层面,分别在门和属水平上展示各组5周和9周龄时物种具体组成以了解菌群的整體情况,并在属水平上基于bray-curtis距离矩阵,采用UPGMA算法进行层次聚类分析以展示组间菌群组成的相似性。通过线性判别分析效应量(linear discriminant analysis effect size, LEfSe)筛选5周龄和9周龄时组间差异物种,并观察肥胖发展和药物干预过程中菌群的变化。使用线性判别分析(linear discriminant analysis effect size, LDA)值分布柱状图展示各组显著富集的物种及其重要性程度,物种分类学分枝图展示在各组样品中标志物种的分类学层次分布。基于标记基因序列来预测功能丰度的软件(phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states, PICRUST2)进行功能潜能预测分析,使用KEGG数

据库(<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)统计9周龄大鼠的菌群二级功能通路的丰度,并基于bray-curtis对功能单元进行PCoA分析并使用metagenomeSeq的方法预测差异代谢通路。使用热图展示差异菌属与宿主表型之间的潜在关系。测序工作由上海派森诺生物科技有限公司协助完成。

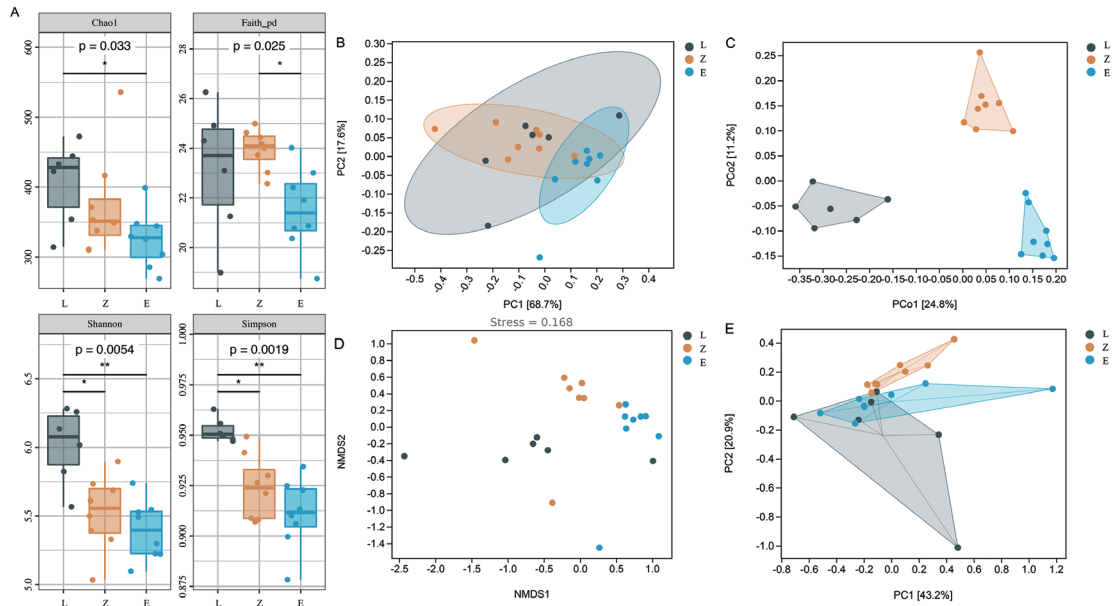
2 结果

2.1 二陈汤干预对肥胖2型糖尿病大鼠模型肠道内容物菌群多样性的影响

实验收集了大鼠9周龄时肠道内容物样本,利用Illumina高通量测序平台对菌群V3~V4区域进行双端测序。去噪后22个样本共获得785 524个序列,质量控制后得到643 161个高质量序列。抽平以确保各样本在同一测序深度水平进行分析,每个样本的序列丰度为21 585。首先观察了大鼠肠道菌群结构的变化,评估了大鼠9周龄时的菌群多样性,Chao1指数、Shannon指数、Simpson指数均显示出ZDF大鼠较实验大鼠多样性降低,Faith_pd指数显示升高,二陈汤干预后降低($P<0.05$)。见图1A。主成分分析(principal component analysis, PCA,图1B)、主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA,图1C)、非量度多维尺度分析(non-metric multidimensional scaling, NMDS,图1D)、多变量统计分析(partial least squares discrimination, PLS-DA,图1E)均是评估组间差异 β 多样性的经典指标,可观察样本间的物种丰度组成差异,描述其分布特征。 β 多样性显示9周龄时3组间肠道内容物菌群组成结构上显著分离。

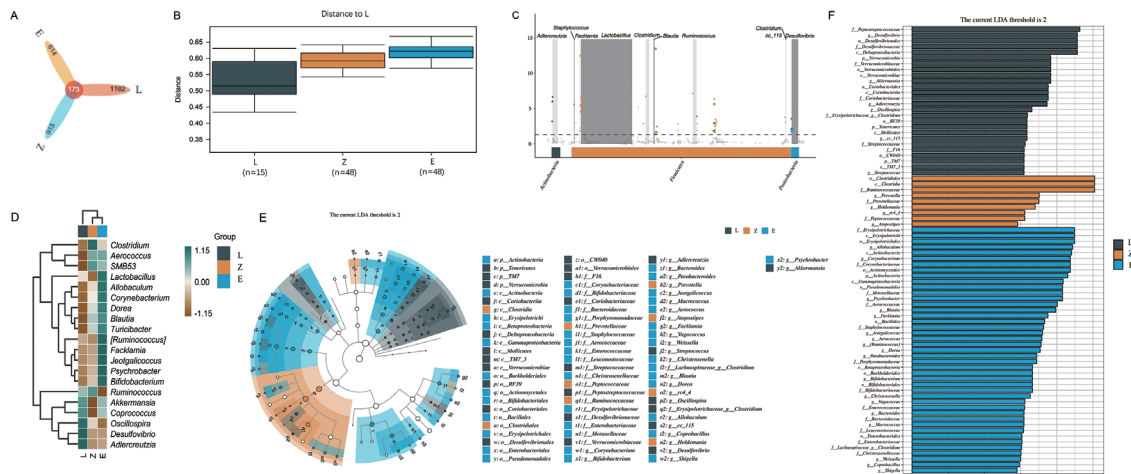
2.2 二陈汤干预后差异菌群的筛选

二陈汤干预后,9周龄时3组间共有ASV/OTU个数为173个,空白对照组特有的为1182个,肥胖2型糖尿病组为915个,二陈汤干预组为614个。见图2A。组间差异分析显示,组间差异大于组内差异,样本可信度高。见图2B。MetagenomeSeq方法对样本组进行两两比较,通过曼哈顿图展示差异ASV/OTU并结合分类学注释,结果可见门水平上,L组中Actinobacteria显著上调,Z组中Firmicutes显著上调,E组中Proteobacteria显著上调。见图2C。为了进一步比较样本间的物种组成差异,实现对各样本的物种丰度分布趋势的展示,使用平均丰度前20位的属的丰度数据绘制热图。见图2D。LEfSe分析可以直接对所有分类水平同时进行差异分析,结果显示9周龄时随着肥胖2型糖尿病的疾病进展,Z组中Firmicutes中的Holdemania、Lactobacillus、Ruminococcus、Atopostipes、rc4_4,Actinobacteria中的Corynebacterium, Bacteroidetes



注: A. 各组间 α 多样性指数 (Chao1 指数、Faith_pd 指数、Shannon 指数、Simpson 指数), 每个 panel 中, 横坐标为组别, 纵坐标为相应 α 多样性指数的值。箱线图中, 上下端线为上下四分位数 (interquartile range, IQR); 中位线为中位数; 上下边缘为最大值和最小值 (1.5 倍的 IQR 范围之内的极值); 在上下边缘的外部点为异常值, 下文箱式图同。Kruskal-Wallis 为事后检验, 验证差异显著性; B. 9 周龄时组间肠道内容物菌群基于未加权 UniFrac 距离的 PCA, 椭圆置信度均为 0.95; C. 9 周龄时组间肠道内容物菌群基于未加权 UniFrac 距离的 PCoA; D. 9 周龄时组间肠道内容物菌群基于未加权 UniFrac 距离的 NMDS 分析; E. 9 周龄时组间肠道内容物菌群基于未加权 UniFrac 距离的 PLS-DA 分析。

图 1 二陈汤调节 ZDF 大鼠肠道内容物菌群结构



注: A. 组间共有或独有 ASV/OTU 个数的花瓣图; B. 组间差异分析箱式图; C. metagenomeSeq 分析的曼哈顿图及差异 ASV/OTU 的分类学注释; D. 物种组成聚类热图; E-F. 差异物种的 LDA 值分布柱状图和分类学分枝图, LDA 评分阈值 >2。

图 2 二陈汤干预改变肠道内容物的菌群组成

中的 *Prevotella*、*Bacteroides* 占据优势地位, 经过二陈汤 4 周的干预, Firmicutes 中的 *Blautia*、*Allobaculum*、*Dorea*、*Macrococcus*、*Clostridium*、*Weissella*、*Lactobacillus*、*Jeotgalicoccus*、*Christensenella*、*Vagococcus*、*Coprobacillus*、*Aerococcus*、*Facklamia*、*Ruminococcus*、Actinobacteria 中的 *Corynebacterium*、*Bifidobacterium*、Proteobacteria 中的 *Psychrobacter*、*Shigella*、Bacteroidetes 中的 *Bacteroides*、*Parabacteroides* 占据优势地位。见图 2E、表 2。通过对比 3 组间优势菌属的变化我们发现, 伴随着疾病进展和药物干预, 上述菌群丰度的变化可能是二陈汤改善肥胖 2 型糖尿病的重要靶点。

2.3 参苓白术散干预对肥胖 2 型糖尿病大鼠模型肠道内容物菌群多样性的影响

对于参苓白术散干预的大鼠 9 周龄时肠道内容物双端测序后, 去噪后 30 个样本共获得 1 173 634 个序列, 质量控制后得到 885 599 个高质量序列。抽平以确保各样本在同一测序深度水平进行分析, 每个样本的序列丰度为 21 286。 α 多样性可见, Chao1 指数、Faith_pd 指数、Shannon 指数、Simpson 指数均显示出 ZDF 大鼠较实验大鼠多样性降低, Chao1 指数在参苓白术散干预后升高。见图 3A。 β 多样性显示, PCA、PCoA、NMDS、PLS-DA 均可见 9 周龄时 3 组间肠道内容物菌

群组成结构上具有较好的分离度。见图3B-图3E。

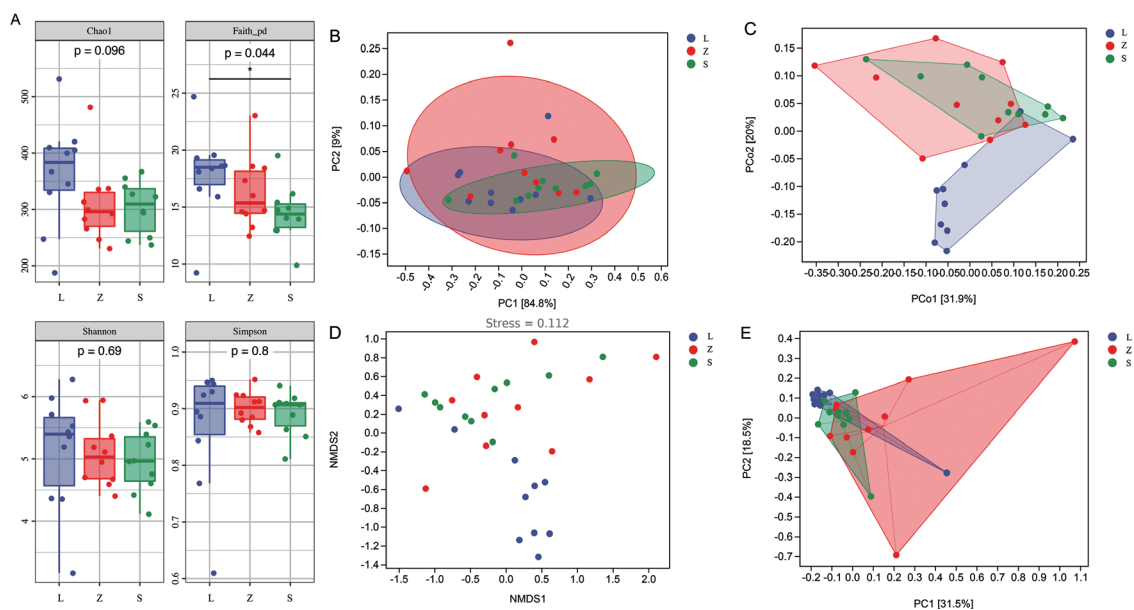
2.4 参苓白术散干预后差异菌群的筛选

参苓白术散干预4周后大鼠9周龄时3组间共有ASV/OTU个数为353个,空白对照组特有

的为1282个,肥胖2型糖尿病组为586个,二陈汤干预组为477个。见图4A。组间差异分析显示,组间差异大于组内差异,样本可信度高。见图4B。metagenomeSeq方法对样本组进行两两比较可见,

表2 二陈汤干预的各组优势菌的LDA得分和P值比较

组别	门	属	丰度	LDA得分	P值
L组优势菌	Firmicutes	<i>Clostridium</i>	3.00	3.32	3.15E-04
	Firmicutes	<i>cc_115</i>	2.66	3.18	3.15E-04
	Proteobacteria	<i>Desulfovibrio</i>	3.35	3.23	2.14E-03
	Actinobacteria	<i>Adlercreutzia</i>	4.07	3.73	4.73E-03
	Firmicutes	<i>_Ruminococcus_</i>	3.13	2.95	1.73E-02
	Verrucomicrobia	<i>Akkermansia</i>	4.17	3.83	2.84E-02
	Firmicutes	<i>Oscillospira</i>	3.69	3.31	3.32E-02
Z组优势菌	Firmicutes	<i>Streptococcus</i>	2.95	3.09	3.66E-02
	Firmicutes	<i>Holdemania</i>	3.34	3.40	9.06E-04
	Actinobacteria	<i>Corynebacterium</i>	4.35	4.04	1.90E-03
	Firmicutes	<i>Lactobacillus</i>	4.82	4.33	1.68E-02
	Firmicutes	<i>Ruminococcus</i>	3.20	3.02	1.74E-02
	Firmicutes	<i>Atopostipes</i>	3.05	2.91	2.04E-02
	Bacteroidetes	<i>Prevotella</i>	2.58	3.51	2.13E-02
	Bacteroidetes	<i>Bacteroides</i>	2.77	3.25	2.34E-02
	Firmicutes	<i>rc4_4</i>	3.02	3.11	4.03E-02
	Firmicutes	<i>Bifidobacterium</i>	3.56	3.29	1.11E-04
E组优势菌	Firmicutes	<i>Blautia</i>	3.71	3.42	7.98E-04
	Firmicutes	<i>Allobaculum</i>	4.74	4.43	8.94E-04
	Firmicutes	<i>Dorea</i>	3.81	3.54	1.01E-03
	Firmicutes	<i>Macroccoccus</i>	3.05	3.09	1.27E-03
	Firmicutes	<i>Clostridium</i>	2.85	3.34	1.27E-03
	Actinobacteria	<i>Corynebacterium</i>	4.69	4.37	1.33E-03
	Firmicutes	<i>Weissella</i>	3.11	3.00	1.62E-03
	Proteobacteria	<i>Psychrobacter</i>	4.46	4.15	1.68E-03
	Firmicutes	<i>Lactobacillus</i>	5.58	5.12	1.74E-03
	Bacteroidetes	<i>Bacteroides</i>	2.82	2.93	5.04E-03
	Firmicutes	<i>Jeotgaliococcus</i>	3.91	3.60	5.49E-03
	Firmicutes	<i>Christensenella</i>	2.37	3.26	6.12E-03
	Firmicutes	<i>Vagococcus</i>	3.37	3.12	7.80E-03
	Firmicutes	<i>Coprobacillus</i>	3.18	2.96	2.06E-02
	Firmicutes	<i>Aerococcus</i>	3.92	3.59	3.46E-02
	Proteobacteria	<i>Shigella</i>	2.93	2.90	3.61E-02
	Firmicutes	<i>Facklamia</i>	4.09	3.75	3.97E-02
	Firmicutes	<i>_Ruminococcus_</i>	3.86	3.57	4.05E-02
	Bacteroidetes	<i>Parabacteroides</i>	2.10	3.44	4.90E-02



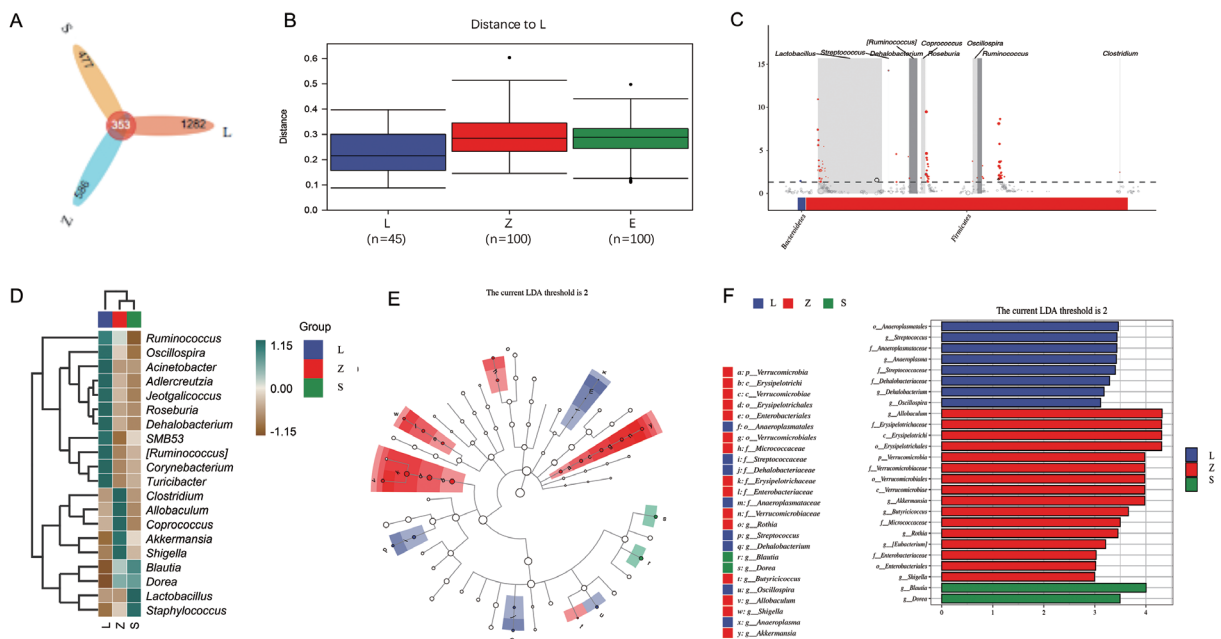
注: A. 各组间 α 多样性指数(Chao1 指数、Faith_pd 指数、Shannon 指数、Simpson 指数); B. 9周龄时组间肠道内容物菌群基于未加权 UniFrac 距离的 PCA, 椭圆置信度均为 0.95; C. 9周龄时组间肠道内容物菌群基于未加权 UniFrac 距离的 PCoA; D. 9周龄时组间肠道内容物菌群基于未加权 UniFrac 距离的 NMDS 分析; E. 9周龄时组间肠道内容物菌群基于未加权 UniFrac 距离的 PLS-DA 分析。

图3 参苓白术散调节ZDF大鼠肠道内容物菌群结构

门水平上, L组中Bacteroidetes显著上调, Z组中Firmicutes显著上调。见图4C。Z组中水平的变化与前文一致。为了进一步比较样本间的物种组成差异, 实现对各样本的物种丰度分布趋势的展示, 使用平均丰度前20位的属的丰度数据绘制热图。见图4D。LEfSe分析结果显示, 随着肥胖2型糖尿病的疾病进展, 9周龄时的Z组中Firmicutes中的*Allobaculum*、*Eubacterium*、*Coprococcus*、*Butyricoccus*, Actinobacteria中的*Rothia*, Verrucomicrobia中的*Akkermansia*, Proteobacteria中的*Shigella*占据优势地位, 经过参苓白术散4周的干预, Firmicutes中的*Lactobacillus*、*Blautia*、*Dorea*占据优势地位。见图4E, 表3。这些菌属丰度的改变可能是参苓白术散改善肥胖2型糖尿病的关键靶点。

2.5 二陈汤与参苓白术散肠道菌群预测功能异同分析

运用预测微生物群落功能(phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states, PICRUSt2)技术, 基于样本中的标记基因序列丰度来预测样本功能丰度。结果可见二陈汤与参苓白术散丰度占前20位的一致度较高, 集中在生物合成、前体代谢物和能量产生、退化/利用/同化等方面。见表4。使用归一化的pathway/group丰度表, 依据分组情况, 调用fitFeatureModel函数, 使用zero-inated log-normal model对每个pathway/group的分布进行拟合, 并使用该模型的拟合结果判别差异的显著性, 可见二方对于菌群的影响差异体现在: 二陈汤调节的差异功能在PWY-6731(淀粉降



注: A. 组间共有或独有 ASV/OTU 个数的花瓣图; B. 组间差异分析箱式图; C. metagenomeSeq 分析的曼哈顿图及差异 ASV/OTU 的分类学注释; D. 物种组成聚类热图; E-F. 差异物种的 LDA 值分布柱状图和分类学分支图, LDA 评分阈值 >2。

图4 参苓白术散干预改变肠道内容物的菌群组成

表3 参苓白术散干预的各组优势菌的LDA得分和P值比较

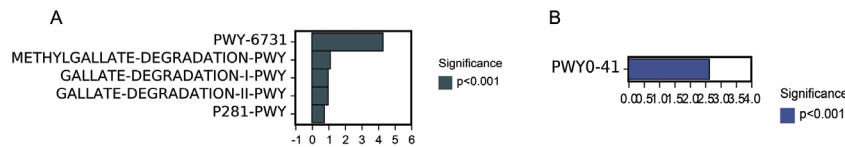
组别	门	属	丰度	LDA得分	P值
L组优势菌	Firmicutes	<i>Dehalobacterium</i>	2.81	3.18	1.14E-03
	Firmicutes	<i>Oscillospira</i>	3.38	3.11	1.68E-03
	Firmicutes	<i>Ruminococcus</i>	3.86	3.50	9.40E-03
	Firmicutes	<i>Streptococcus</i>	2.58	3.43	9.41E-03
	Tenericutes	<i>Anaeroplasma</i>	1.64	3.42	4.03E-02
Z组优势菌	Firmicutes	<i>Allobaculum</i>	4.59	4.32	1.92E-03
	Actinobacteria	<i>Rothia</i>	2.38	3.45	4.15E-03
	Firmicutes	<i>Eubacterium</i>	2.47	3.21	8.29E-03
	Firmicutes	<i>Coprococcus</i>	4.34	3.99	9.03E-03
	Firmicutes	<i>Butyricoccus</i>	2.20	3.66	1.44E-02
	Verrucomicrobia	<i>Akkermansia</i>	4.27	3.98	1.66E-02
	Proteobacteria	<i>Shigella</i>	2.82	3.00	4.20E-02
	S组优势菌	Firmicutes	<i>Lactobacillus</i>	5.54	5.15
Firmicutes		<i>Blautia</i>	4.37	4.00	1.20E-03
Firmicutes		<i>Dorea</i>	3.79	3.49	4.38E-03

解 III)、METHYL GALLATE-DEGRADATION-PWY(没食子酸甲酯降解)、GALLATE-DEGRADATION-I-PWY(没食子酸盐降解 I)、GALLATE-DEGRADATION-

II-PWY(没食子酸盐降解 II)、P281-PWY(3-苯基丙酸酯降解), 参苓白术散则在 PWY0-41[尿囊素降解 IV(厌氧)]。见图 5。

表 4 二陈汤和参苓白术散预测通路丰度前 20 位

二陈汤			参苓白术散		
第一等级	第二等级	丰度	第一等级	第二等级	丰度
生物合成	核苷和核苷酸生物合成	43 744.10	生物合成	核苷和核苷酸生物合成	39 970.47
生物合成	氨基酸生物合成	30 326.69	生物合成	氨基酸生物合成	25 863.02
生物合成	辅因子、辅基、电子载体和 维生素生物合成	22 269.41	生物合成	辅因子、辅基、电子载体和维 生素生物合成	17 664.02
生物合成	脂肪酸和脂质生物合成	15 237.91	生物合成	脂肪酸和脂质生物合成	14 604.98
前体代谢物和能量的产生	发酵	13 860.65	前体代谢物和能量的产生	发酵	13 441.58
生物合成	细胞结构生物合成	12 412.87	生物合成	细胞结构生物合成	12 890.32
生物合成	碳水化合物生物合成	10 860.93	生物合成	碳水化合物生物合成	9 592.76
退化/利用/同化	碳水化合物降解	8 699.14	退化/利用/同化	碳水化合物降解	9 391.35
退化/利用/同化	羧酸盐降解	8 586.14	退化/利用/同化	羧酸盐降解	8 954.41
退化/利用/同化	核苷和核苷酸降解	6 583.97	生物合成	次生代谢物生物合成	5 879.90
生物合成	次生代谢物生物合成	6 302.47	前体代谢物和能量的产生	糖酵解	5 295.96
前体代谢物和能量的产生	糖酵解	5 517.85	退化/利用/同化	核苷和核苷酸降解	5 106.37
前体代谢物和能量的产生	戊糖磷酸途径	3 206.22	前体代谢物和能量的产生	戊糖磷酸途径	3 013.30
退化/利用/同化	C1 复合利用和同化	2 659.36	退化/利用/同化	高分子化合物降解	2 088.52
退化/利用/同化	高分子化合物降解	2 361.90	退化/利用/同化	C1 复合利用和同化	1 958.79
退化/利用/同化	次生代谢物降解	2 236.98	退化/利用/同化	次生代谢物降解	1 902.16
生物合成	芳香族化合物生物合成	2 011.26	排毒	抗生素耐药性	1 861.89
排毒	抗生素耐药性	1 828.29	生物合成	芳香族化合物生物合成	1 660.34
前体代谢物和能量的产生	光合作用	1 771.43	生物合成	氨基酰基-tRNA 充电	1 468.27
生物合成	氨基酰基-tRNA 充电	1 591.03	代谢簇	tRNA 充电	1 468.27



注: A. 二陈汤预测差异通路; B. 参苓白术散预测差异通路。图中横轴 $\log_{FC}[\log_2(\text{fold change})]$ 的正值代表上调组相对对照组上调, 负值为下调; 纵坐标为不同的 pathway/group 标签; 以不同颜色展示显著性程度。

图 5 二陈汤和参苓白术散干预后肠道菌群预测差异通路

3 讨论

肥胖促使包括 2 型糖尿病在内的诸多慢性代谢性疾病的发病率和病死率持续增加, 持续控制体质量有利于 2 型糖尿病的缓解。中医学认为肥胖以本虚标实为主, 脾虚为本, 痰湿为标。脾喜燥恶湿, 易为湿邪所困遏, 水液运化失司, 积于体内酿为痰湿。而痰湿之邪的形成是肥胖发生的始动因素。痰湿内生, 积于体内, 进一步促使其他病理产物生成, 故而为肥胖演变的核心环节^[5]。元代朱震亨《丹溪治法心要·中风》中首次提出:“肥白人多痰湿。”^[6]肥胖日久常变生它病,《素问·通评虚实论篇》云:“凡治消瘵、仆击、偏枯、痿厥、气满发逆, 肥贵人, 则高粱之疾也”, 即是表明肥胖是众多疾病发病的土壤。二陈汤是燥湿化痰首方, 又有健脾渗湿行气之功, 标本兼顾, 是治疗痰湿的有效方剂。脾胃位于中焦, “升降之枢纽, 全在脾土之运用, 土旺则阳升阴降, 营卫周流, 百骸康泰矣。”肥胖和 2 型糖尿病的早期多表现为脾滞的病理状态, 中后期多为脾虚的病理

状态^[7]。明代李梴在《医学入门》中提出:“养脾则津液自生, 参苓白术散是也。”其通过益气健脾恢复脾主运化的功能, 延缓肥胖 2 型糖尿病的发生与发展。

二陈汤和参苓白术散均始见于北宋《太平惠民和剂局方》。二陈汤全方以半夏为君, 燥湿化痰, 降逆和胃。橘红为臣, 理气行滞, 以助化痰之效; 以茯苓、乌梅、生姜为佐, 茯苓渗湿健脾, 以杜生痰之源; 生姜助半夏、橘红降逆化痰, 同时制半夏之毒; 乌梅收敛肺气, 祛痰不伤正。甘草为使, 调和诸药。诸药合用, 燥湿化痰, 且能健脾、行气, 标本兼顾, 为治痰之基础方。清代汪昂《医方集解·除痰之剂》称:“治痰通用二陈”^[8], 临床上以二陈汤为主方治疗肥胖及高脂血症、非酒精性脂肪肝等代谢性疾病取得了显著疗效。饮食不节, 过食肥甘, 脾虚失运, 湿浊内生复困脾气, 终成脾虚湿困, 这也是 2 型糖尿病常见证型之一。参苓白术散健脾气、滋脾阴、渗脾湿, 升降相因、散收并用、补行兼施^[9], 其中人参重在补益, 白

术健脾燥湿,茯苓健脾渗湿,此三者为君。山药平补脾肺肾三脏,薏苡仁健脾渗湿止泻,白扁豆补脾化湿,莲子补脾益肾,此四者为臣,以助君药健脾益气渗湿。砂仁醒脾行气,桔梗培土生金;甘草健脾和中,调和诸药,共为佐使。清代李用粹《证治汇补·消渴》言:“五脏之精悉运于脾,脾旺则心肾相交,脾健则津液自化,故参苓白术散为收功之神药也。”^[10]参苓白术散既往主要用于消化系统疾病的治疗,近年来根据异病同治的原则也广泛运用于肥胖、2型糖尿病的等代谢性疾病。

近年来,许多中草药已被证明是预防和治疗肥胖2型糖尿病的潜在治疗剂。中草药中的多糖、皂苷、萜类等物质被肠道菌群降解/发酵产生低聚糖和SCFA等,能促进有益菌生长并调节机体生理。一些中药小化学分子经菌群转化后生物活性增强^[11]。二陈汤中药物及其提取物或有效成分的代谢改善作用与宿主肠道菌群变化之间有密切联系。例如,陈皮提取物以剂量和时间依赖性动态调节肥胖小鼠肠道菌群的组成,改善结肠中代谢进程尤其是苯甲酸衍生物,是陈皮抗肥胖的重要机制^[12]。生姜增加肥胖小鼠肠道中*Bifidobacterium*(双歧杆菌属)和产SCFAs的细菌,与FMT有相似的减肥和调节微生物作用^[13]。参苓白术散联合二甲双胍对2型糖尿病肥胖患者的血糖降低效果更佳,空腹血糖及HbA1c水平明显降低、胰岛素水平明显增高,其机理可能与增加肠道中双歧杆菌和拟杆菌的表达有关^[14]。此外,作为两方的共有药物,茯苓^[15]及甘草多糖^[16]也可通过调节宿主肠道菌群的组成及代谢达到改善代谢紊乱及疾病症状的目的。这提示此两方具有改变宿主肠道菌群的潜力,可能与其改善肥胖2型糖尿病的作用有关。

在二陈汤主治痰湿向参苓白术散主治脾虚转变的过程中,两方共同升高的菌属为Firmicutes中的*Lactobacillus*、*Blautia*、*Dorea*,而其调控的不同之处在于二陈汤可以降低Firmicutes中的*Holdemania*、*Ruminococcus*、*Atopostipes*、*rc4_4*, Actinobacteria中的*Corynebacterium*, Bacteroidetes中的*Prevotella*、*Bacteroides*,同时增加Firmicutes中的*Blautia*、*Allobaculum*、*Dorea*、*Macrocococcus*、*Clostridium*、*Weissella*、*Lactobacillus*、*Jeotgalicoccus*、*Christensenella*、*Vagococcus*、*Coproccillus*、*Aerococcus*、*Facklamia*、*Ruminococcus*, Actinobacteria中的*Corynebacterium*、*Bifidobacterium*, Proteobacteria中的*Psychrobacter*、*Shigella*以及Bacteroidetes中的

Bacteroides、*Parabacteroides*,而参苓白术散则可以降低Firmicutes中的*Allobaculum*、*Eubacterium*、*Coprococcus*、*Butyricococcus*, Actinobacteria中的*Rothia*, Verrucomicrobia中的*Akkermansia*, Proteobacteria中的*Shigella*以改善糖脂代谢紊乱,延缓肥胖2型糖尿病的发生发展。当今研究一再证实肠道菌群的异常是导致宿主肥胖的重要原因^[17]。更多的科学研究发现了某些与肥胖密切相关的特定肠道细菌,比如Firmicutes/Bacteroidetes^[18], *Bifidobacterium*、*Clostridium*、*Ruminococcus*、*Akkermansia*等的丰度变化可能作为肥胖发生的潜在预测指标^[19-20]。而经过饮食、药物或者手术干预等方式,在改善肥胖个体表型的同时肠道菌群结构和功能也逐渐趋向于正常水平。而在2型糖尿病人群中也有类似的发现,2型糖尿病患者Firmicutes和Clostridiales微生物比例较显著降低,而Proteobacteria微生物数量增多, *Bacteroidetes/Prevotella*、*Bacteroidetes/Firmicutes*、*Clostridium coccoides/Eubacterium rectale*与血糖浓度呈正相关,而与体质量指数无关;变形菌纲数量与血糖浓度呈正相关^[21-22]。另有研究发现在严重肥胖的人群中细菌或细菌碎片与2型糖尿病的发生有关。肥胖患者的肠道屏障更容易渗透,引发炎症过程,最终阻止胰岛素作用于各代谢器官发挥调节代谢功能的作用,而导致血糖水平的失调^[23]。本研究进一步证实在肥胖向2型糖尿病进展过程中菌群组成的差异,这种差异除了反映在疾病进程外,也与证型转化有关。二陈汤和参苓白术散分别作用于不同阶段,调节不同的菌群,从而分别达到化痰祛湿、改善脂质代谢和健脾益气渗湿、调节糖脂代谢的目的。

进一步预测差异菌群调控的代谢通路可见共有通路包括生物合成、前体代谢物和能量产生、退化/利用/同化等,差异通路则体现在二陈汤调节的差异功能在淀粉降解Ⅲ、没食子酸甲酯降解、没食子酸盐降解I、没食子酸盐降解Ⅱ、3-苯基丙酸酯降解,参苓白术散则在尿囊素降解Ⅳ(厌氧)。研究表明没食子酸是诸多中草药植物的主要成分之一,指一种天然多酚类化合物,具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗病毒、抗菌等多种生物活性^[24],尤其在降脂方面有着巨大的潜力,能够调节肝组织功能,降低血脂和血糖水平,改善糖脂代谢紊乱^[25]。没食子酸甲酯是没食子酸的衍生物,具有广泛的生物学活性,包括抗氧化、抗炎和抗微生物活性^[26]。这提示二陈汤所调节的差异肠道菌群与淀粉和脂质代谢的作用相关度更

高,在抗有害菌及降脂方面有潜在研究价值,这也可能是二陈汤调节痰湿内盛的生物学本质之一。尿囊素则大量存在于山药中,其能促进细胞生长,抑制细胞凋亡,控制炎症^[27],调节抗氧化能力、血脂水平,促进胰高血糖素样肽-1的释放,恢复 β 细胞功能,与保持正常的胰岛素和血糖水平有关,从而改善糖尿病及相关并发症^[28]。这提示参苓白术散调节肠道菌群与糖代谢密不可分,其可能通过尿囊素代谢途径调控糖脂代谢水平。

4 结论

本研究基于肠道菌群对二陈汤和参苓白术散“同病异治”肥胖2型糖尿病的异同点进行了初步的探索。无论是从传统中医还是现代医学角度都证实了二陈汤和参苓白术散在肥胖及2型糖尿病等代谢性疾病中的疗效。本研究提示二者均具有调节宿主肠道菌群的潜力,二者调节菌属之异同可能是“同病异治”中医理念的生物学基础之一。对于其中的作用机制仍需要后续的实验加以验证。

参考文献

- [1] 张晨宁,王小雨,周佳丽,等.基于中药整合药理学探究参芪地黄汤与加味真武汤“同病异治”糖尿病肾病作用机制的异同[J].沈阳药科大学学报,2022,39(3):283-295.
- [2] 赵灿,杨金伟,吴勇军,等.茯苓杏仁甘草汤与橘枳姜汤“同病异治”冠状动脉粥样硬化性心脏病[J].中医学报,2019,34(11):2412-2417.
- [3] ZHAO T, ZHAN L, ZHOU W, et al. The effects of erchen decoction on gut microbiota and lipid metabolism disorders in zucker diabetic fatty rats [J]. *Front Pharmacol*, 2021 (12): 647529.
- [4] 张栎婧,战丽彬,杭天怡,等.基于肠道菌群探讨参苓白术散改善慢性炎症防治ZDF大鼠肥胖2型糖尿病[J].中国中药杂志,2022,47(4):988-1000.
- [5] 胡慧君,刘莉,隋艳波,等.浅析代谢综合征与中医“痰湿”理论的关系[J].中医学报,2020,48(6):30-32.
- [6] 朱震亨.丹溪治法心要[M].济南:山东科学技术出版社,1985.
- [7] 仝小林.脾瘅新论代谢综合征的中医认识及治疗[M].北京:中国中医药出版社,2018.
- [8] 汪昂.医方集解[M].周鸿飞,刘永辉,点校.郑州:河南科学技术出版社,2017:137.
- [9] 臧凝子,王世文,李品,等.基于文献及计量学方法研究脾阴学说古今发展及参苓白术散滋补脾阴作用阐释[J].中华中医药学刊,2024,42(3):210-214,293.
- [10] 李用.证治汇补[M].太原:山西科学技术出版社,2011:230.
- [11] 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.
- [12] ZHANG M, ZHU J, ZHANG X, et al. Aged citrus peel (chenpi) extract causes dynamic alteration of colonic microbiota in high-fat diet induced obese mice [J]. *Food and Function* 2020, 11 (3): 2667-2678.
- [13] WANG J, WANG P, LI D, et al. Beneficial effects of ginger on prevention of obesity through modulation of gut microbiota in mice [J]. *Eur J Nutr*, 2020, 59 (2): 699-718.
- [14] 蒋海燕,葛锁华,于雪冰,等.参苓白术散联合二甲双胍对糖尿病肥胖患者肠道菌群的影响及不良反应观察[J].甘肃科学学报,2020,32(6):9-13,77.
- [15] ZHU L, YE C, HU B F, et al. Regulation of gut microbiota and intestinal metabolites by poria cocos oligosaccharides improves glycolipid metabolism disturbance in high-fat diet-fed mice [J]. *Nutr Biochem*, 2022, 107: 109019.
- [16] YE J, MA J, ROZI P, et al. The polysaccharides from seeds of glycyrrhiza uralensis ameliorate metabolic disorders and restructure gut microbiota in type 2 diabetic mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 264 (1): 130622.
- [17] ZHANG L, WANG P, HUANG J, et al. Gut microbiota and therapy for obesity and type 2 diabetes [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2024, 15: 1333778.
- [18] NEHMI-FILHO V, DE FREITAS J A, FRANCO L A, et al. Modulation of the gut microbiome and firmicutes phylum reduction by a nutraceutical blend in the obesity mouse model and overweight humans: a double-blind clinical trial [J]. *Food Sci Nutr*, 2024, 12 (4): 2436-2454.
- [19] HOSEINI T Z, EJTAHED H S, ATLASI R, et al. Alteration in gut microbiota composition of older adults is associated with obesity and its indices: a systematic review [J]. *Nutr Health Aging*, 2023, 27 (10): 817-823.
- [20] LI Z, ZHANG B, WANG N, et al. A novel peptide protects against diet-induced obesity by suppressing appetite and modulating the gut microbiota [J]. *Gut*, 2023, 72 (4): 686-698.
- [21] SHI H, YUY, LIN D, et al. β -glucan attenuates cognitive impairment via the gut-brain axis in diet-induced obese mice [J]. *Microbiome*, 2020, 8 (1): 143.
- [22] AKHERATI M, SHAFAEI E, SALEHINIYA H, et al. Comparison of the frequency of periodontal pathogenic species of diabetics and non-diabetics and its relation to periodontitis severity, glycemic control and body mass index [J]. *Clinical and Experimental Dental Research*, 2021, 7 (6): 1080-1088.
- [23] FERNANDO F. ANHÊ, JENSEN B A H, VARIN T V, et al. Type 2 diabetes influences bacterial tissue compartmentalisation in human obesity [J]. *Nature Metabolism*, 2020, 2 (3): 233-242.
- [24] KAHKESHANI N, FARZAEI F, FOTOUHI M, et al. Pharmacological effect of gallic acid in health and disease: a mechanistic review [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2019, 22 (3): 225-237.
- [25] 郗艳丽,赵峻秀,陈响,等.没食子酸对高脂血症小鼠的保护作用[J].中国兽医杂志,2022,58(2):79-83.
- [26] 李启凤,李一凡,张金芳,等.没食子酸甲酯抑制胶质瘤细胞中Akt和ERK1/2活性发挥抗肿瘤作用[J].宁夏医科大学学报,2020,42(8):757-764.
- [27] 赵耀,杨建华,谯明,等.尿囊素对糖尿病肾病大鼠肾脏保护作用及机制探讨[J].新疆医科大学学报,2020,43(8):1025-1030.
- [28] ZHAO Y, QIAO M, WANG X, et al. Allantoin reduces glucotoxicity and lipotoxicity in a type 2 diabetes rat model by modulating the PI3K and MAPK signaling pathways [J]. *Heliyon*, 2024, 10 (10): e34716.