



## 研究报告

## 参豉对气虚血瘀模型大鼠肠道微生物及其代谢多样性的影响

孙银玲 陈丽艳 陈继亮 王萍 曹阳 丁纯洁 王伟明\*

黑龙江省中医药科学院 黑龙江 哈尔滨 150036

**摘要:**【背景】参豉为人参与大豆采用自淡豆豉中分离获得的优势益生菌株共同发酵而成。已证明对气虚血瘀模型大鼠血液指标具有明显的调节作用,但对肠道微生态作用尚不明确。【目的】以气虚血瘀模型大鼠为材料,探讨参豉对肠道微生态是否具有调节作用。【方法】采用长期“力竭游泳+饥饿”方法建立大鼠气虚血瘀模型,造模同时分别灌胃给药参豉高、中、低剂量(每日 6、3、1.5 g/kg 体重)及补阳还五汤剂 60 d 后,分析肠道 6 种常驻菌群数量变化;并采用 Biolog-ECO 自动微生物鉴定系统研究大鼠肠道微生物的代谢情况。【结果】参豉能够促进气虚血瘀模型大鼠肠道中有益菌脆弱拟杆菌、乳酸菌及双歧杆菌的增殖,调节肠杆菌及肠球菌数量使其趋于正常水平,并抑制有害菌产气荚膜梭菌的增殖。Biolog 结果显示参豉高剂量组 *AWCD* 值与空白组接近;培养 48 h 时,模型组 Shannon 指数、Shannon 均匀度、Simpson 指数以及 McIntosh 指数均显著高于空白组,差异显著( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ),而参豉高剂量组 Shannon 指数、Shannon 均匀度、Simpson 指数与空白组相接近,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),与模型组相比差异极显著( $P<0.01$ );聚类分析与主成分分析显示参豉各剂量组与空白组、模型组、补阳还五汤组差异明显,可能与不同剂量参豉对气虚血瘀模型大鼠肠道微生态的调节作用相关。【结论】参豉对气虚血瘀模型大鼠肠道菌群具有明显的改善作用。

关键词: 参豉, 肠道微生物, 常驻菌, Biolog-ECO, 代谢多样性

## Effect of Shenchì on intestinal microbiota and their metabolism diversity in rats with qi deficiency and blood stasis

SUN Yin-Ling CHEN Li-Yan CHEN Ji-Liang WANG Ping CAO Yang

DING Chun-Jie WANG Wei-Ming\*

Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang 150036, China

**Abstract:** [Background] Shenchì was obtained through co-fermentation with the soybean (*Glycine max*

**Foundation items:** Special Research Projects Supported by China Agriculture Research System (CARS-21); Joint Guidance Project of Natural Science Foundation by Heilongjiang Province (LH2019H094); Project of Applied Technology Research and Development Plan Supported by Harbin (2017RAQXJ236)

\*Corresponding author: Tel: 86-451-55665478; E-mail: wangweiming\_2018@163.com

Received: 24-07-2019; Accepted: 22-11-2019; Published online: 29-11-2019

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金资助(CARS-21); 黑龙江省自然科学基金联合引导项目(LH2019H094); 哈尔滨市应用技术研究开发资金(2017RAQXJ236)

\*通信作者: Tel: 0451-55665478; E-mail: wangweiming\_2018@163.com

收稿日期: 2019-07-24; 接受日期: 2019-11-22; 网络首发日期: 2019-11-29

(L.) Merr.), Ginseng (*Panax Ginseng* C.A.Mey.), and the fermentation probiotics (*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*), that was obtained from the Sojae Semen Praeparatum in our laboratory. It has obvious regulation effect on blood index of rats with qi deficiency and blood stasis, and the effect on intestinal micro-ecology is still unclear. **[Objective]** In order to investigate the effect, that the intestinal micro-ecology for Shenchi on of rats with qi deficiency and blood stasis. **[Methods]** The rat model of qi deficiency and blood stasis was constructed by the method, that was “exhaustive swimming+restricted diet” with a long-term. Animal models were treated with the high, medium and low doses of Shenchi and Buyang huanwu decoction by intragastric administration for 60 days. After 60 days’ treatment, analyzed change in the number of six resident bacteria; and the carbon sources metabolism was determined by Biolog-ECO microbial identification system. **[Results]** The results showed that the Shenchi could promote the proliferation of beneficial bacteria including *Bacteroides fragilis*, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in the intestinal flora of rats with qi deficiency and blood stasis, the Shenchi could regulate the number of *Enterobacter* and *Enterococci* to normal levels, and inhibit proliferation of *Clostridium perfringens*. Biolog results showed the *AWCD* value of the high dose group, which was similar to the normal group. At 48 h cultivation period, the value of Shannon index, Shannon evenness, Simpson index and McIntosh index were significantly higher in the model group than in the normal group, ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). The Shannon index, Shannon evenness, and Simpson index of the high-dose group were similar to the normal group ( $P>0.05$ ), and the values were significantly difference compared with the model group ( $P<0.01$ ). Cluster analysis and principal component analysis showed that different dose groups of Shenchi were distinct from the normal group, model group and Buyang huanwu decoction group, which may be related to the regulation of intestinal microbes in rats with qi deficiency and blood stasis. **[Conclusion]** Shenchi had a significant improvement on the intestinal flora of rats with qi deficiency and blood stasis.

**Keywords:** Shenchi, Intestinal microbiota, Resident bacteria, Biolog-ECO, Metabolic diversity

参豉为人参与大豆经微生物发酵而成的新型豆豉,是依据宋徽宗赵佶所著《圣济总录》中的阿胶饮方,根据淡豆豉的发酵原理,以种植人参和东北小粒黄豆作为发酵基质,采用自淡豆豉中分离获得的优势益生菌株进行纯种发酵制备而成。参豉的纤溶酶活性与豆豉相比明显提高,并且经过发酵能够实现人参皂苷的体外生物转化,有利于人体吸收以提高生物利用度,增强其益气作用;同时参豉为经益生菌发酵而成的特殊发酵食品,对肠道微生物具有调节作用(已接收,待发表)。

健康成年人的肠道栖息着大约  $10^{14}$  数量级微生物,依据其需氧程度不同可以分为厌氧菌、兼性厌氧菌、需氧菌,其中 90%–99.9%为兼性厌氧菌或厌氧菌。已知肠道菌群主要包括肠杆菌属、肠球菌属、双歧杆菌属、乳酸菌属、拟杆菌属、荚膜梭菌属等至少 14 个菌属。它们与人体之间的关系错综复杂,参与机体营养物质的消化吸收、生物拮抗、

免疫等生命活动,贯穿于人体各种生理活动和病理过程。因此宿主及饮食等外环境变化,易引起肠道微生物失调<sup>[1-2]</sup>。此外,劳倦内伤、年老体弱、气血不足等易导致气虚血瘀,使血液运行无力,瘀血停滞于体内,进而阻滞肠腑气机运转,肠络失和,肠道传导失司,最终导致便秘、溃疡性结肠炎等疾病,同时也会引起肠道菌群发生改变<sup>[3-5]</sup>。

Biolog-ECO 微孔板是用于检测微生物群体代谢功能多样性的方法之一,主要基于微生物群体的生物和生化特性,根据微生物对羧酸、糖类、氨基酸、大分子聚合物、胺类和其他类等 31 种碳源的利用情况进行分析,从而快速表征样品中微生物群体的生态状况<sup>[6-7]</sup>。利用 Biolog-ECO 系统研究肠道微生物对特定碳源代谢能力的变化,可以了解参豉对气虚血瘀模型大鼠肠道微生物的菌群结构及其代谢是否具有调控作用。本文结合《保健食品检验与评价技术规范》2003 版中“调节肠道菌群功能”的

技术评价规范<sup>[8]</sup>, 选取 6 种人体常驻菌为目标菌用以考察参豉对气虚血瘀模型大鼠肠道菌群的调节作用<sup>[9]</sup>, 研究结果将有助于阐明参豉对哺乳动物肠道微生物菌群数量及微生物代谢多样性的影响, 揭示其作用机理, 为参豉的应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

清洁级 Wistar 大鼠 60 只, 雌雄各半, 体质量  $260 \pm 20$  g, 由黑龙江省哈尔滨医科大学实验动物学部提供。许可证号 SCXK (黑) 2013-001。

### 1.2 药物

参豉: 以种植人参和大豆作为发酵基质, 采用本实验室前期自淡豆豉中分离获得的优势益生菌株进行纯种发酵而成,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。结合前期研究结果考虑纤溶酶活性受热降解, 选择新鲜参豉匀浆后给药。取适量参豉与生理盐水按照质量比 1:1 的比例匀浆, 配制成 50% (质量体积比) 的参豉母液,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

人参(5年生, 2017年采收)购自吉林省百济堂参业有限公司, 经黑龙江省中医药科学院王伟明研究员鉴定为五加科植物人参(*Panax Ginseng* C.A.Mey.)的干燥根。黄豆为黑龙江省农业科学院种植, 经黑龙江省中医药科学院王伟明研究员鉴定为豆科植物大豆(*Glycine max* (L.) Merr.)的干燥成熟种子。菌种经中国工业微生物菌种保藏管理中心鉴定为枯草芽孢杆菌枯草亚种(*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*)。

补阳还五汤(记载于清代王清任所著《医林改错》, 为治疗气虚血瘀证经典方剂): 黄芪(生) 120 g, 当归尾 6 g, 赤芍 5 g, 地龙 3 g, 川芎 3 g, 红花 3 g, 桃仁 3 g。均购自黑龙江省中医医院。按上述配比, 称取适量药物, 加 10 倍量水常规煎煮 2 次, 每次 1 h, 合并煎液, 浓缩至生药浓度为 2 g/mL,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.3 培养基、主要试剂及仪器

Biolog-ECO Microplate, Biolog 公司; 类杆

菌-胆汁-七叶苷琼脂(BBE), 伊红美蓝琼脂(EMB), LBS 琼脂(LBS), 莫匹罗星锂盐改良 MRS 培养基(MRS), Pfizer 肠球菌选择性琼脂(PSE), 胰酪-亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂基础(TSC), 分别用于脆弱拟杆菌、肠杆菌、乳酸菌、双歧杆菌、肠球菌及产气荚膜梭菌的数量测定, 以上培养基均购自青岛海博生物技术有限公司。动物饲料由黑龙江省中医药科学院动物实验中心提供。

Biolog 微生物自动分析仪, Biolog 公司; 厌氧培养箱, 上海跃进医疗器械有限公司; 生物安全柜, 北京东联哈尔仪器制造有限公司; 菌落计数/显微细胞分析仪, 杭州迅数科技有限公司。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 动物分组及造模方法

60 只大鼠适应性饲养 7 d 后, 随机分为空白组、模型组、参豉高、中、低剂量组、补阳还五汤组, 共 6 组, 每组 10 只, 雌雄各半, 分笼饲养。

在中医理论指导下, 结合现代医学技术及研究方法, 建立气虚血瘀动物模型。除空白组外, 其他各组每天进行力竭游泳实验, 将大鼠置于水深  $35 \pm 5$  cm, 水温  $15 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 直径 90 cm 的桶中进行游泳, 以每组大鼠自然沉降没入水中 3–5 s 不能自主上浮为其疲惫标准。当全组有 50% 出现自然沉降时, 停止游泳捞出, 使之暴露于空气中自然晾干, 连续造模 60 d。每日力竭游泳后各组给予正常饮食量的 1/2 (饲料按照每天每只大鼠 40 g/kg 体重喂养)<sup>[10-15]</sup>。

#### 1.4.2 给药方法

采用造模与给药同时进行的方法, 每日灌胃给药 1 次, 连续造模给药 60 d, 空白组和模型组给予生理盐水, 其余各组按大鼠临床等效用药剂量给药, 即参豉高、中、低剂量分别为每日 6、3、1.5 g/kg 体重(其中参豉中剂量为成人每日用量), 阳性对照组为补阳还五汤每日 13 g/kg 体重<sup>[16-17]</sup>。

### 1.5 检测指标及方法

#### 1.5.1 大鼠粪便样本的采集及处理

大鼠造模给药 60 d, 腹主动脉取血后立即处死

大鼠, 无菌条件下采集各组大鼠结肠段粪便。并在无菌条件下称取粪便样品 1 g, 加入 10 mL 无菌生理盐水, 涡旋振荡使微生物分散均匀,  $1\ 000\times g$  离心 5 min, 取上清液倍比稀释为浓度  $10^{-2}$ – $10^{-5}$  g/mL, 制备菌悬液。

### 1.5.2 肠道 6 种常驻菌分析

6 种选择性培养基按照提供的说明配制、灭菌后倾注培养皿中备用。选择合适的稀释度, 采用涂布法计数, 好氧菌如肠杆菌及肠球菌培养 48 h 计数, 厌氧菌如脆弱拟杆菌、乳酸杆菌、双歧杆菌及产气荚膜梭菌培养 72 h 计数<sup>[9,18]</sup>。计算每克粪便中含有菌落数 CFU/g。

### 1.5.3 Biolog-ECO 分析

采用含有 31 种碳源的 Biolog-ECO 微孔板分析肠道微生物代谢多样性, 通过检测氧化还原指示剂的吸光度变化来反映微生物对底物的利用程度。微生物在碳源代谢过程中产生自由电子, 与四唑紫产生特定的颜色反应, 颜色的深度可以反映微生物的碳源利用程度。不同的微生物能够利用不同的碳源, 即不同的代谢功能。肠菌混悬液制备方法同 1.5.1, 取  $10^{-3}$  g/mL 浓度的菌悬液迅速接种至 Biolog-ECO 微孔板中(每孔 150  $\mu$ L), 于 37  $^{\circ}$ C 恒温厌氧培养 24、48、72、96、120、144、168 h, 利用 Biolog 微生物鉴定系统读取数据。

## 1.6 统计学方法

(1) 参豉对气虚血瘀证模型大鼠肠道微生物的代谢活性用每孔平均颜色变化率(AWCD)来描述, 计算公式如下:

$$AWCD = \Sigma(C_i - R) / n$$

式中,  $C_i$  为各碳源孔在 590 nm 下的吸光度值与 750 nm 下吸光度值的差值;  $R$  为 ECO 板对照孔的吸光度值,  $n$  为 Biolog-ECO 微孔板的 C 源数目 31<sup>[19-20]</sup>。

(2) 基于 Biolog-ECO 微孔板培养 48 h 的数据, 计算微生物代谢功能多样性指数研究微生物群体的多样性<sup>[1,7,19,21-22]</sup>。

Shannon 指数( $H'$ ): 衡量微生物群体的丰富度

和均匀度。

$$H' = -\Sigma P_i \ln P_i;$$

$$P_i = (C_i - R) / \Sigma(C_i - R)$$

$P_i$  为第  $i$  (1–31) 孔中的吸光度值与所有孔的总吸光度值之比。

Shannon 均匀度( $E$ ): 根据 Shannon 指数计算的均匀度。

$$E = H' / \ln S$$

式中,  $S$  表示碳源(31 个碳源)代谢孔的数目, 即颜色变化的孔的数量( $C_i - R > 0$ , 则表示该孔碳源被利用, 为反应孔)。

Simpson 多样性指数( $D$ ): 表示最常见物种丰度的敏感性。

$$D = 1 - \Sigma P_i^2$$

McIntosh 指数( $U$ ): 评估微生物群体集合的多样性。

$$U = \sqrt{\Sigma n_i^2}$$

式中,  $n_i$  表示第  $i$  孔的相对吸光度值( $C_i - R$ )。

数据用 Microsoft Excel 2007 计算 AWCD 值及多样性指数, GraphPad Prism 6 作图, SPSS 24.0 软件系统进行聚类分析和主成分分析(principal component analysis, PCA), 所有数据均为 3 次重复的平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 气虚血瘀模型大鼠的观察指标

在造模过程中, 模型大鼠在单次游泳力竭后表现出明显的气虚症状, 可见呼吸急促, 气喘, 没有反抗能力, 不去理毛, 站立不稳、左右摇晃等。用于实验的大鼠应在每次游泳后出现明显的力竭情况, 使其出现“劳则耗气”久而成虚的病理特征<sup>[14]</sup>。以体征、体质量及耐疲劳时间作为指标评价模型, 模型组与空白组相比, 皮毛杂乱且黯淡枯槁、爪甲色淡、舌质黯紫, 体质量增长速度显著变慢( $P < 0.05$ ), 耐疲劳时间明显缩短( $P < 0.05$ ); 给药组与模型组相比毛色、爪甲、舌质色泽接近空白组, 体质量及耐疲劳时间与空白组无显著性差异。

2.2 参朮对肠道 6 种常驻菌属的影响

肠道微生物在 6 种选择性培养基的生长情况及菌落形态如图 1 和表 1 所示。

采用稀释平板菌落计数法对大鼠肠道内 6 种常驻菌进行分析, 结果如表 2 所示。(1) 气虚血瘀模型大鼠肠道内乳酸菌、双歧杆菌及肠球菌的数量与空白组相比明显降低, 差异极显著( $P<0.01$ ); 脆弱拟杆菌数量与空白组相比明显降低; 肠杆菌及产气荚膜梭菌的数量与空白组相比明显升高, 差异极显著( $P<0.01$ )。(2) 给予高、中、低剂量参朮调节后, 大鼠肠道内脆弱拟杆菌、乳酸菌及双歧杆菌数量明显增加, 并随给药剂量的增高而增加; 高、中剂量组的脆弱拟杆菌数量与空白组及模型组相比, 差异显著( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ); 参朮高、中、低剂量组的乳酸菌及双歧杆菌数量与模型组相比, 差异极

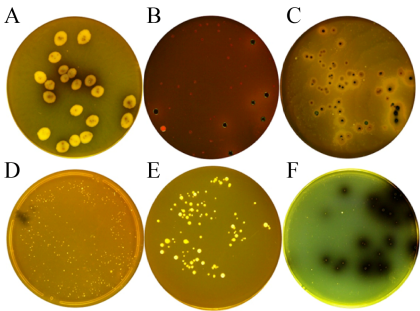


图 1 肠道微生物在不同选择性培养基的菌落形态  
Figure 1 Colony morphology of intestinal microbes on different selective media

注: A: 类杆菌-胆汁-七叶苷琼脂(BBE); B: 伊红美蓝琼脂(EMB); C: 胰酪-亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂基础(TSC); D: 莫匹罗星锂盐改良 MRS 培养基(MRS); E: LBS 琼脂(LBS); F: Pfizer 肠球菌选择性琼脂(PSE).  
Note: A: BBE agar (BBE); B: Eosin-methylene blue agar (EMB); C: Tryptose sulfite-cyloserine agar base (TSC); D: Li-mupirocin MRS medium, modified (MRS); E: LBS agar (LBS); F: Pfizer *Enterococcus* selective agar (PSE).

表 1 肠道微生物在不同选择性培养基的菌落特征

Table 1 Colony characteristics of intestinal microbes on different selective media

菌属	培养基	菌落形态
Culture type	Culture medium	Colonial morphology
拟杆菌属 <i>B. fragilis</i>	类杆菌-胆汁-七叶苷琼脂	(1) 菌落略圆形, 较大且边缘不规则, 菌落表面乳白色, 微凸起, 表面光滑有光泽, 中心处有红褐色斑点
	BBE	(1) The colonies are close to round, large and irregular in edge. The surface of the colony is milky white, slightly convex, smooth and shiny, there are reddish-brown spots at the center
肠杆菌属 <i>Enterobacter</i>	伊红美蓝琼脂	(2) 菌落圆形, 较小, 白色, 菌落周围有深褐色光圈, 凸起, 表面光滑有光泽, 不透明
		(2) The colonies were round, small, white, and with a dark brown aperture around them, the colonies were convex, smooth, shiny surface and opaque
		(3) 菌落圆形, 紫黑色, 并带有绿色金属光泽, 表面凸起
产气荚膜梭菌属 <i>C. perfringens</i>	胰酪-亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂基础	(1) 菌落圆形, 粉红色, 或中心为黑色, 表面凸起, 不透明
		(2) 菌落圆形, 黑色, 微凸起, 周围有不透明的晕
		(2) The colonies were round, pink, or black in the center, with a raised surface and opaque
双歧杆菌属 <i>Bifidobacterium</i>	莫匹罗星锂盐改良 MRS 培养基	(3) 菌落圆形, 乳白色, 微凸起, 菌落中心为黑色, 不透明
		(2) The colonies were round, milky white, slightly raised, opaque and the center of the colony is black
		(3) 菌落圆形, 乳白色, 微凸起
乳酸菌属 <i>Lactobacillus</i>	LBS 琼脂	(3) The colonies were round, milky white, and slightly
		菌落圆形, 白色, 较小, 微凸起, 不透明
肠球菌属 <i>Enterococci</i>	Pfizer 肠球菌选择性琼脂	Colony round, white, small, slightly raised, opaque
		菌落圆形, 白色或深褐色, 周围有黑色的晕, 半透明
	PSE	The colony is round, white or dark brown with a black halo around it and translucent

表 2 参豉对气虚血瘀模型大鼠肠道 6 种常驻菌数量的影响

Table 2 Effect of Shenchì on six species of intestinal microbiota in rat with qi deficiency and blood stasis

Groups	脆弱拟杆菌 <i>B. fragilis</i> ( $\times 10^4$ CFU/g)	乳酸菌 <i>Lactobacillus</i> ( $\times 10^6$ CFU/g)	双歧杆菌 <i>Bifidobacterium</i> ( $\times 10^6$ CFU/g)	肠杆菌 <i>Enterobacter</i> ( $\times 10^6$ CFU/g)	肠球菌 <i>Enterococci</i> ( $\times 10^6$ CFU/g)	产气荚膜梭菌 <i>C. perfringens</i> ( $\times 10^6$ CFU/g)
空白组 The normal group	9.67 $\pm$ 1.52Cd	4.25 $\pm$ 0.22BCDEF	4.22 $\pm$ 0.20BCDEF	0.22 $\pm$ 0.09BE	0.97 $\pm$ 0.14BF	3.01 $\pm$ 0.31BCEF
模型组 The model group	0.83 $\pm$ 0.57CD	3.03 $\pm$ 0.19ACDEF	2.06 $\pm$ 0.17ACDEF	0.94 $\pm$ 0.09ACDEF	0.15 $\pm$ 0.03ACDEF	7.43 $\pm$ 0.20ACDEF
参豉高剂量组 The Shenchì high dose group	70.00 $\pm$ 12.5ABDEF	6.26 $\pm$ 0.26ABDEF	5.49 $\pm$ 0.25ABDEF	0.21 $\pm$ 0.03BE	0.99 $\pm$ 0.13BdF	0.97 $\pm$ 0.09ABDEF
参豉中剂量组 The Shenchì middle dose group	36.00 $\pm$ 6.87aBCf	5.04 $\pm$ 0.49ABCEF	3.68 $\pm$ 0.19ABCEF	0.25 $\pm$ 0.05BEf	0.83 $\pm$ 0.11BcEF	3.32 $\pm$ 0.11BCEF
参豉低剂量组 The Shenchì low dose group	17.00 $\pm$ 1.77C	3.73 $\pm$ 0.14ABCDF	3.11 $\pm$ 0.23ABCDF	0.38 $\pm$ 0.04ABCDF	1.07 $\pm$ 0.07BDF	4.27 $\pm$ 0.26ABCDF
补阳还五汤组 The Buyang huanwu decoction group	12.17 $\pm$ 3.18Cd	1.8 $\pm$ 0.11ABCDE	1.12 $\pm$ 0.04ABCDE	0.15 $\pm$ 0.01BdE	0.43 $\pm$ 0.08ABCDE	5.32 $\pm$ 0.34ABCDE

注：与空白组相比：a:  $P<0.05$ , A:  $P<0.01$ ；与模型组相比：b:  $P<0.05$ , B:  $P<0.01$ ；与参豉高剂量组相比：c:  $P<0.05$ , C:  $P<0.01$ ；与参豉中剂量组相比：d:  $P<0.05$ , D:  $P<0.01$ ；与参豉低剂量组相比：e:  $P<0.05$ , E:  $P<0.01$ ；与补阳还五汤组相比：f:  $P<0.05$ , F:  $P<0.01$ 。  
Note: Compared with the normal group: a:  $P<0.05$ , A:  $P<0.01$ ; Compared with the model group: b:  $P<0.05$ , B:  $P<0.01$ ; Compared with the Shenchì high dose group: c:  $P<0.05$ , C:  $P<0.01$ ; Compared with the Shenchì middle dose group: d:  $P<0.05$ , D:  $P<0.01$ ; Compared with the Shenchì low dose group: e:  $P<0.05$ , E:  $P<0.01$ ; The Buyang huanwu decoction group: f:  $P<0.05$ , F:  $P<0.01$ .

显著( $P<0.01$ )。参豉高、中、低剂量组的肠球菌数量与模型组相比明显增加，差异极显著( $P<0.01$ )；与空白组相接近，差异无统计学意义。参豉高、中、低剂量组的肠杆菌数目与模型组相比明显降低，差异极显著( $P<0.01$ )，且高、中剂量组与空白组相接近，差异无统计学意义。参豉高、中、低剂量组产气荚膜梭菌的数量与模型组相比明显降低，差异极显著( $P<0.01$ )，并且高剂量组明显低于空白组，差异极显著( $P<0.01$ )。(3) 补阳还五汤治疗调节后大鼠肠道内脆弱拟杆菌数量高于模型组及空白组，但差异无统计学意义，低于参豉高、中剂量组，差异显著( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )；乳酸菌、双歧杆菌数量与空白组、模型组、参豉高、中、低剂量组相比明显降低，差异极显著( $P<0.01$ )；肠杆菌数量低于空白组及模型组，与模型组相比差异极显著( $P<0.01$ )；肠球菌数量高于模型组，低于空白组、参豉高、中、低剂量组，差异极显著( $P<0.01$ )；产气荚膜梭菌的数量低于模型组，但高于空白组、参豉高、中、低

剂量组，差异极显著( $P<0.01$ )。结果显示，参豉对模型大鼠肠道中的有益菌如脆弱拟杆菌、乳酸菌、双歧杆菌有增殖作用；能够调节模型大鼠肠道中肠球菌及肠杆菌数量与空白组相接近；抑制模型大鼠肠道中有害菌产气荚膜梭菌的增殖。补阳还五汤对模型大鼠乳酸菌、双歧杆菌具有抑制作用，对脆弱拟杆菌、肠球菌、肠杆菌、产气荚膜梭菌的调节作用弱于参豉。

2.3 参豉对气虚血瘀模型大鼠肠道微生物 AWCD 值的影响

平均颜色变化率 (average well color development, AWCD)常用于衡量微生物群体中微生物利用不同碳源的能力<sup>[6,23]</sup>。实验结果如图 2 所示，厌氧培养的 24–48 h 内，各组 AWCD 值变化较大，在 48 h 之后，各组的 AWCD 值变化趋势不明显。气虚血瘀模型大鼠给予高剂量参豉后 AWCD 值接近于空白组；参豉低剂量组、补阳还五汤组与模型组 AWCD 值比较接近；而参豉中剂量组 AWCD 值



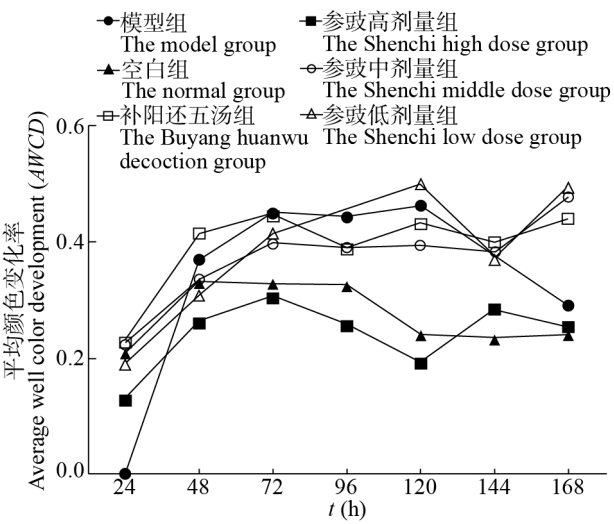


图 2 不同组大鼠肠道微生物 AWCD 随培养时间的变化  
Figure 2 Changes of intestinal microorganism AWCD in rats at different groups with culturing times

介于两者之间。结果表明模型组与空白组相比, 肠道微生物碳源代谢能力发生明显变化。参朮高剂量组能够调节气虚血瘀模型大鼠肠道微生物接近正常水平; 补阳还五汤对于气虚血瘀模型大鼠肠道微生物的调节作用弱于参朮高、中剂量组。

2.4 参朮对气虚血瘀模型大鼠肠道微生物多样性的影响

Shannon 指数、Shannon 均匀度、Simpson 指数和 McIntosh 指数常用于衡量微生物多样性。由 2.3 结果可知, AWCD 值在厌氧培养的 24–48 h 内变化较大; 在 48 h 之后各组的 AWCD 值变化趋势不明显, 因此选择“拐点”处 48 h 的数据进行肠道微生物多样性分析, 此时 Biolog-ECO 微孔板的培养时间可以最大限度满足肠道微生物的生长, 在一定程度上可以更准确地反映不同组肠道微生物的差异性<sup>[24]</sup>。如表 3 所示, Shannon 指数、Shannon 均匀度、Simpson 指数以及 McIntosh 指数模型组均高于空白组, 且差异显著( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ); 参朮高剂量组 Shannon 指数、Shannon 均匀度及 Simpson 指数与空白组相接近, 差异无统计学意义, 与模型组相比差异极显著( $P<0.01$ ); 参朮中剂量组 Shannon 均匀度、McIntosh 指数与模型组相比降低, 并具有显著性差异( $P<0.05$ ); 参朮高、低剂量组的 McIntosh 指数与模型组相比降低, 并且低剂量组具有显著性差异( $P<0.05$ )。气虚血瘀模型大

表 3 不同组大鼠肠道微生物的多样性和均匀度指数

Table 3 The diversity and evenness index of intestinal microbiota in rats of different groups

组别 Groups	Shannon 指数 Shannon index ( $H'$ )	Shannon 均匀度 Shannon evenness ( $E$ )	Simpson 指数 Simpson index ( $D$ )	McIntosh 指数 McIntosh index ( $U$ )
空白组 The normal group	2.592±0.146BdeF	0.777±0.041BDEF	0.888±0.031BDEF	2.561±0.113b
模型组 The model group	2.945±0.132AC	0.960±0.015ACdf	0.947±0.003AC	3.237±0.124ace
参朮高剂量组 The Shenchì high dose group	2.630±0.103BdeF	0.775±0.046BDEF	0.901±0.011BDeF	2.748±0.055
参朮中剂量组 The Shenchì middle dose group	2.883±0.027ac	0.907±0.004AbC	0.939±0.002AC	2.580±0.316b
参朮低剂量组 The Shenchì low dose group	2.854±0.189ac	0.917±0.015AC	0.936±0.012Ac	2.529±0.454bf
补阳还五汤组 The Buyang huanwu decoction group	2.970±0.083AC	0.895±0.025AbC	0.942±0.007AC	3.067±0.386

注: 与空白组相比: a:  $P<0.05$ , A:  $P<0.01$ ; 与模型组相比: b:  $P<0.05$ , B:  $P<0.01$ ; 与参朮高剂量组相比: c:  $P<0.05$ , C:  $P<0.01$ ; 与参朮中剂量组相比: d:  $P<0.05$ , D:  $P<0.01$ ; 与参朮低剂量组相比: e:  $P<0.05$ , E:  $P<0.01$ ; 与补阳还五汤组相比: f:  $P<0.05$ , F:  $P<0.01$ 。  
Note: Compared with the normal group: a:  $P<0.05$ , A:  $P<0.01$ ; Compared with the model group: b:  $P<0.05$ , B:  $P<0.01$ ; Compared with the Shenchì high dose group: c:  $P<0.05$ , C:  $P<0.01$ ; Compared with the Shenchì middle dose group: d:  $P<0.05$ , D:  $P<0.01$ ; Compared with the Shenchì low dose group: e:  $P<0.05$ , E:  $P<0.01$ ; The Buyang huanwu decoction group: f:  $P<0.05$ , F:  $P<0.01$ .

鼠肠道微生物的结构与数量发生明显变化, 导致模型大鼠肠道微生物的 Shannon 指数、Shannon 均匀度、Simpson 指数以及 McIntosh 指数与空白组相比明显升高且具有显著性差异。不同剂量的参芪对气虚血瘀模型大鼠肠道微生物有较好的调节作用, 使其趋于正常水平。

## 2.5 不同组大鼠肠道微生物群落代谢变化的聚类分析

Biolog-ECO 微孔板含有 31 种碳源如表 4 所示, 主要由羧酸类、糖类、氨基酸类、大分子聚合物类、胺/酰胺类及其他类等 6 类碳源组成<sup>[1,6]</sup>。由图 3 可知, 当聚类距离 $\leq 5$  时, 空白组的碳源被聚为 7 类, 模型组的碳源被聚为 8 类, 参芪高剂量组的碳源被聚为 5 类, 参芪中剂量组的碳源被聚为 7 类、低剂量组的碳源被聚为 6 类, 补阳还五汤组的碳源被聚为 7 类, 气虚血瘀模型大鼠肠道微生物对碳源的利用与空白组相比相对多样化。在各组中 D-半乳糖醛酸、D-半乳糖内酯、D-木糖、葡萄糖-1-磷酸盐、丙酮酸甲酯、N-乙酰基-D-葡萄糖胺、L-天冬酰胺酸均聚为一类, 空白组有丙酮酸甲酯、N-乙酰基-D-葡萄糖胺未聚在该类, 补阳还五汤组有 L-天冬酰胺酸未聚在该类。参芪高、中、低剂量组中葡萄糖-1-磷酸盐、D-半乳糖醛酸、D-木糖、L-天冬酰胺酸、丙酮酸甲酯、D-半乳糖内酯、N-乙酰基-D-葡萄糖胺聚为一类, 参芪高、中剂量组中还有丝氨酸聚在该类, 参芪中、低剂量组中还有肝糖、 $\alpha$ -D-乳糖、甘氨酸-L-谷氨酸、 $\alpha$ -环式糊精聚在该类。参芪不同剂量组肠道微生物对不同碳源的代谢和利用与模型组、空白组及补阳还五汤组有差异, 可能与其对肠道微生物调节作用相关。

## 2.6 不同组大鼠肠道微生物群落代谢变化的主成分分析

由于不同组别大鼠肠道微生物对某些碳源的利用可能是相似的, 因而导致 Biolog-ECO 获得的大量数据可能存在较多的信息重复。主成分分析 (PCA) 使变量简化降维, 通过对吸光度相关性矩阵的变换, 解释不同组别大鼠肠道微生物碳源利用的差异<sup>[22,25-26]</sup>。PCA 结果显示空白组、模型组、参

芪高、中、低剂量组及补阳还五汤组中, 成分 1 的方差贡献率分别为: 62.387%、68.096%、78.194%、59.101%、73.815%及 66.725%。

分析载荷图中 6 个组别大鼠肠道微生物对 31 种碳源的代谢特点, 由图 4 可知, 空白组中 PC1 在  $\beta$ -甲基-D-葡萄糖苷、甘氨酸-L-谷氨酸、D-甘露醇、

表 4 Biolog-ECO 微孔板 31 种碳源的分布碳源  
Table 4 The distribution of 31 carbon sources in Biolog-ECO microplate

编号 No.	碳源 Carbon source
A1	水 Water
B1	丙酮酸甲酯 Pyruvic acid methyl ester
C1	吐温-40 Tween-40
D1	吐温-80 Tween-80
E1	A-环式糊精 $\alpha$ -cyclodextrin
F1	G 肝糖 Lycogen
G1	D-纤维二糖 D-cellobiose
H1	A-D-乳糖 $\alpha$ -D-lactose
A2	B-甲基-D-葡萄糖苷 $\beta$ -methyl-D-glucoside
B2	D-木糖 D-xylose
C2	I-赤藻糖醇 I-erythritol
D2	D-甘露醇 D-mannitol
E2	N-乙酰基-D-葡萄糖胺 N-acetyl-D-glucosamine
F2	D-葡萄糖胺 D-glucosaminic
G2	葡萄糖-1-磷酸盐 Glucose-1-phosphate
H2	D,L- $\alpha$ -甘油 D,L- $\alpha$ -glycerol
A3	D-半乳糖酸 $\gamma$ 内酯 D-galactonic acid $\gamma$ -lactone
B3	D-半乳糖醛酸 D-galacturonic
C3	2-羟基苯甲酸 2-hydroxy benzoic acid
D3	4-羟基苯甲酸 4-hydroxy benzoic acid
E3	$\gamma$ -羟基丁酸 $\gamma$ -hydroxybutyric acid
F3	衣康酸 Itaconic acid
G3	$\alpha$ -丁酮酸 $\alpha$ -ketobutyric acid
H3	D-苹果酸 D-malic acid
A4	L-精氨酸 L-arginine
B4	L-天冬酰胺酸 L-asparagine
C4	L-苯基丙氨酸 L-phenylalanine
D4	L-丝氨酸 L-serine
E4	L-苏氨酸 L-threonine
F4	甘氨酸-L-谷氨酸 Glycyl-L-glutamic acid
G4	苯乙基胺 Phenylethyl-amine
H4	腐胺 Putrescine



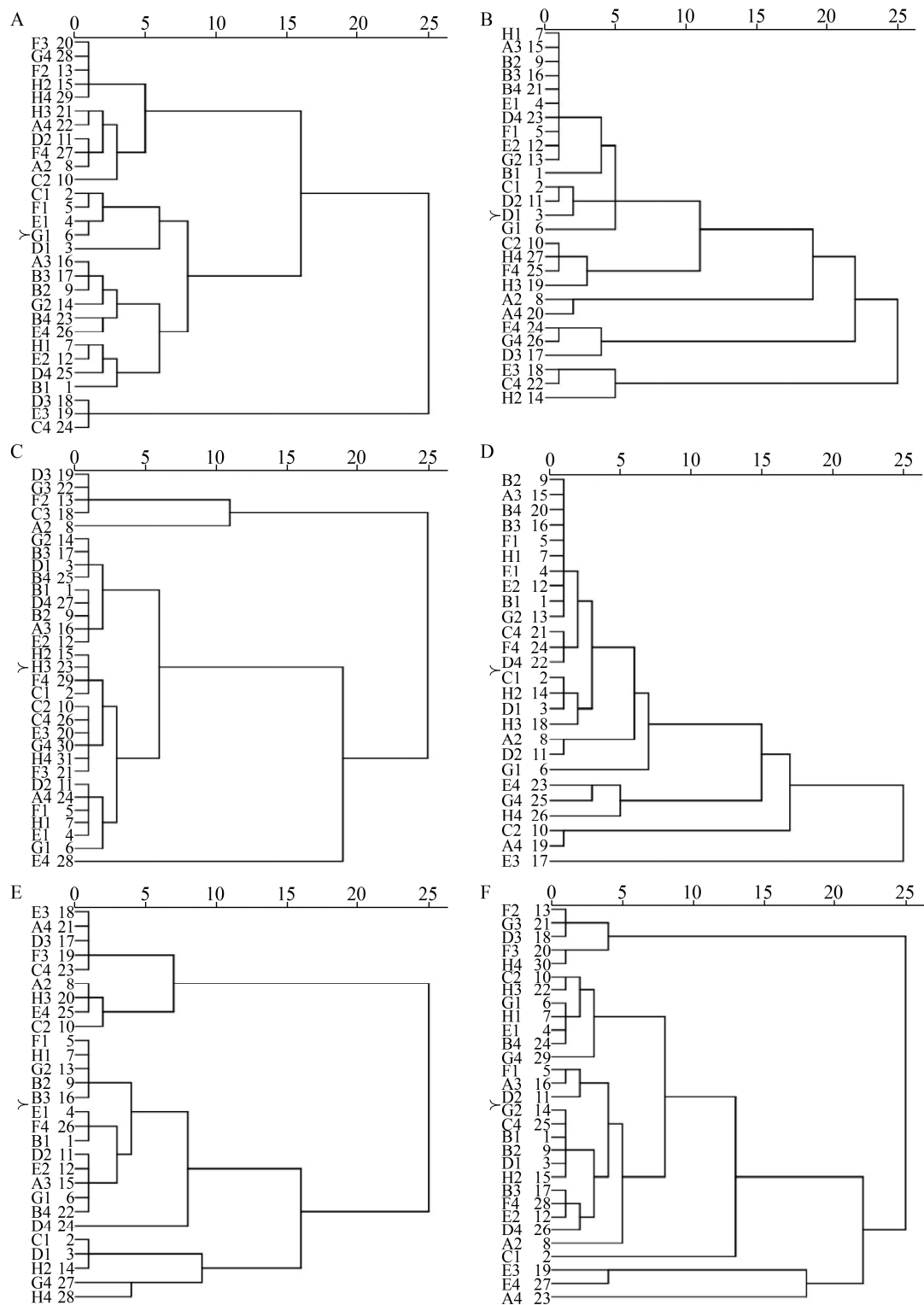


图 3 不同组大鼠肠道微生物碳源代谢聚类分析图

Figure 3 Cluster analysis of carbon source metabolism by intestinal microbiota in different groups of rats

注: A: 空白组; B: 模型组; C: 参朮高剂量组; D: 参朮中剂量组; E: 参朮低剂量组; F: 补阳还五汤组.

Note: A: The normal group; B: The model group; C: The Shenchi high dose group; D: The Shenchi middle dose group; E: The Shenchi low dose group; F: The Buyang huanwu decoction group.

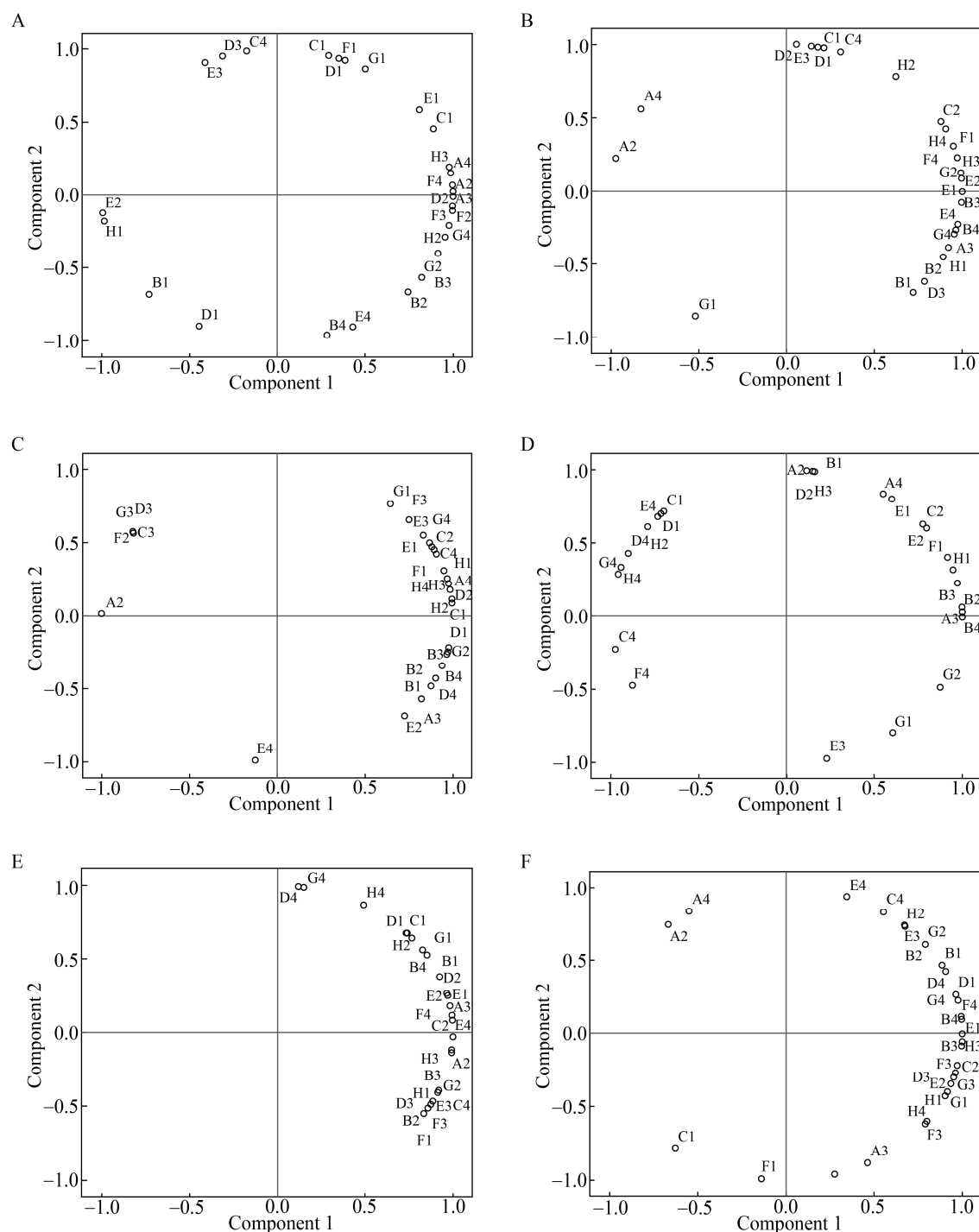


图4 不同组别大鼠肠道微生物碳源代谢的主成分分析

**Figure 4** Principal component analysis of carbon substrates metabolized by intestinal microbiota in rats of different groups

注: A: 空白组; B: 模型组; C: 参芪高剂量组; D: 参芪中剂量组; E: 参芪低剂量组; F: 补阳还五汤组.

Note: A: The normal group; B: The model group; C: The Shenchi high dose group; D: The Shenchi middle dose group; E: The Shenchi low dose group; F: The Buyang huanwu decoction group.

腐胺、D-半乳糖内酯、N-乙酰基-D-葡萄糖胺等碳源种类上有较高的载荷,表明空白组中这些碳源对 PC1 的贡献率比较大。模型组中 PC1 在 N-乙酰基-D-葡萄糖胺、D-半乳糖醛酸、D-苹果酸、葡萄糖-1-磷酸盐、L-丝氨酸、 $\alpha$ -环式糊精等碳源上有较高的载荷。参芪高剂量组中 PC1 在  $\beta$ -甲基-D-葡萄糖苷、D-甘露醇、吐温-40、L-精氨酸、D,L- $\alpha$ -甘油等碳源上有较高的载荷。参芪中剂量组中 PC1 在 L-天冬酰胺酸、D-木糖、D-半乳糖内酯、L-苯基丙氨酸、D-半乳糖醛酸等碳源上有较高的载荷。参芪低剂量组中 PC1 在 L-苏氨酸、D-半乳糖内酯、I-赤藻糖醇、D-苹果酸、 $\beta$ -甲基-D-葡萄糖苷等碳源上有较高的载荷。补阳还五汤组中 PC1 在 D-半乳糖醛酸、 $\alpha$ -环式糊精、D-苹果酸、L-天冬酰胺酸、甘氨酸-L-谷氨酸等碳源上有较高的载荷。

空白组中 PC2 在 L-苯基丙氨酸、L-天冬酰胺酸、吐温-40、4-羟基苯甲酸、肝糖等碳源种类上有较高的载荷,表明空白组中这些碳源对 PC2 的贡献率比较大。模型组中 PC2 在 D-甘露醇、 $\gamma$ -羟基丁酸、吐温-40、吐温-80、L-苯基丙氨酸等碳源种类上有较高的载荷。参芪高剂量组中 PC2 在 L-苏氨酸等碳源种类上有较高的载荷。参芪中剂量组中 PC2 在  $\beta$ -甲基-D-葡萄糖苷、D-苹果酸、丙酮酸甲酯、D-甘露醇、 $\gamma$ -羟基丁酸等碳源种类上有较高的载荷。参芪低剂量组中 PC2 在 L-丝氨酸、苯乙基胺等碳源种类上有较高的载荷。补阳还五汤组中 PC2 在肝糖、D-甘露醇、L-苏氨酸等碳源种类上有较高的载荷。

### 3 讨论与结论

肠道微生物与宿主之间的相互调节及其对健康的重要影响逐渐被人们所重视,肠道微生物群落结构失调与许多疾病密切相关,如炎症性肠病、糖尿病、肥胖症、神经精神疾病、心血管疾病等<sup>[1,7,27]</sup>。肠道微生物可以产生活性物质或调节肠道中的内分泌细胞影响其合成代谢,从而发挥局部或全身效应<sup>[28]</sup>。本研究通过检测参芪对气虚血瘀模型大鼠

肠道 6 种常驻菌的影响,及通过 Biolog-ECO 数据分析,明确参芪确实对肠道微生物具有调节作用。给予参芪后能够上调气虚血瘀模型大鼠肠道中乳酸菌、双歧杆菌、脆弱拟杆菌的数量,由于乳酸菌等有益菌的迅速增加变为优势菌种,能够争夺营养物质和定殖位点、影响微生物代谢途径和增强免疫功能来抑制大肠杆菌、产气荚膜梭菌的增殖<sup>[1,29]</sup>。肠杆菌、产气荚膜梭菌均为条件致病菌,在健康人体内不产生副作用,但在疾病、营养不良、外伤及肠道菌群失衡的情况下可致病,肠杆菌与梭菌的增多与癌症和衰老密切相关<sup>[17,30]</sup>;参芪能够调节气虚血瘀模型大鼠肠杆菌的数量使其趋于正常水平,并抑制产气荚膜梭菌的增殖。肠球菌为人体肠道正常菌群之一,可以改善血脂代谢,参与肠道胆固醇吸收,加速粪便的排泄率,从而降低血中胆固醇的水平<sup>[31]</sup>;参芪能够调节模型大鼠肠球菌的数量接近正常水平。

Biolog 数据分析显示,培养 48 h 时大鼠肠道微生物多样性发生明显变化。Shannon 指数是用于衡量相同情况下不同组大鼠肠道微生物利用碳源的丰富度和均匀度的综合指标,肠道微生物群落 Shannon 多样性指数值越大,表明肠道微生物群落功能多样性越高。Shannon 均匀度指数则表示根据 Shannon 指数计算的均匀度,包含肠道微生物的种类数目(丰富度)及种类中肠道微生物分布的均匀性。肠道微生物种类数目越多,多样性越大;种类之间肠道微生物个体分配的均匀性增加也会使肠道微生物群落多样性提高。Simpson 指数和 McIntosh 指数是衡量不同组大鼠肠道微生物中某些最常见种的优势度和均匀度的指数<sup>[1,6-7,26,32-33]</sup>。参芪不同剂量组大鼠肠道微生物其 Shannon 指数、Shannon 均匀度、Simpson 指数以及 McIntosh 指数均低于模型组,差异显著,并与空白组相接近,表明不同剂量的参芪能够调节气虚血瘀模型大鼠肠道微生物趋于正常水平;AWCD 值常用于衡量微生物群体中微生物利用不同碳源的能力,研究认为变化较大的样品具有较高的碳源代谢能力和微生

物丰度<sup>[23]</sup>, 参豉高剂量组大鼠肠道微生物 *AWCD* 值与空白组接近。聚类分析与主成分分析结果显示参豉不同剂量组与空白组、模型组以及补阳还五组区别明显, 可能与不同剂量参豉对气虚血瘀模型大鼠肠道微生物的调节相关。传统的化学分类无法反映微生物群落对不同碳源的利用情况, 因此我们利用 Biolog-ECO 微孔板的 31 种碳源考察参豉对气虚血瘀模型大鼠肠道群落结构的影响。参豉高剂量组主成分分析显示其中 L-精氨酸和 L-苏氨酸具有较高的贡献率, L-精氨酸为人体半必需氨基酸, 具有促进肝功能恢复、减缓血栓形成、减轻神经衰弱、促进伤口愈合等生理活性, 其衍生物也广泛应用于多个领域<sup>[34]</sup>; L-苏氨酸为人体必需氨基酸, 是一种重要的营养强化剂, 可以缓解人体疲劳, 促进生长发育<sup>[35]</sup>; 由此推断参豉对不同碳源代谢和利用可能与其相应的药理作用相关。此外, 本研究中人参与大豆共同发酵后实现了人参皂苷的体外生物转化, 有利于提高其生物利用度。

采用长期“力竭游泳+饥饿”方法建立大鼠气虚血瘀模型, 具有造模方法稳定、与临床病症结合度高等优点。造模后模型大鼠肠道微生物群落发生了复杂的变化, 为检测肠道菌群与哺乳动物生理状况之间的相关性提供了可能。我们的研究证实, 参豉能够调节气虚血瘀模型大鼠肠道中微生物菌群数量变化及肠道微生物代谢多样性, 研究结果不仅可为参豉的应用提供依据, 也为进一步深入研究哺乳动物肠道微生物的功能奠定了重要的方法学基础。

## REFERENCES

- [1] Wang CH, Zhang HL, Zhang QL, et al. Effects of ultra-micro powder Qiweibaizhusan on metabolism diversity of intestinal anaero-microbiota in diarrheal mice with dysbacteriosis[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(14): 4843-4851 (in Chinese)  
王春晖, 张华玲, 张祺玲, 等. 超微七味白术散对肠道厌氧微生物代谢多样性的调控作用[J]. *生态学报*, 2015, 35(14): 4843-4851
- [2] Chen XQ, Wang N, Jing ZC, et al. Research progress in gut microflora and cardiovascular diseases[J]. *Chinese Journal of Practical Internal Medicine*, 2018, 38(8): 766-769 (in Chinese)
- [3] Wang J, Jiao JL, Yao LY. Research progress on the relationship between blood stasis and ulcerative colitis[J]. *Hebei Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2008, 30(1): 95-97 (in Chinese)  
王敬, 焦君良, 要丽英. 血瘀与溃疡性结肠炎关系的研究进展[J]. *河北中医*, 2008, 30(1): 95-97
- [4] Zhan XH, Wang W, Fu S. The research progress of treating senile constipation from blood stasis[J]. *International Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2015, 37(2): 190-192 (in Chinese)  
占新辉, 王微, 符思. 从血瘀论治老年便秘研究进展[J]. *国际中医中药杂志*, 2015, 37(2): 190-192
- [5] Hu XQ, Chen LG. Talk of the relationship between constipation blood stasis[J]. *Journal of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine*, 2004, 26(1): 34-36 (in Chinese)  
胡小勤, 陈利国. 谈便秘与血瘀的关系[J]. *贵阳中医学院学报*, 2004, 26(1): 34-36
- [6] Ge ZW, Du HJ, Gao YL, et al. Analysis on metabolic functions of stored rice microbial communities by Biolog ECO microplates[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1375
- [7] Zhang HL, Cai Y, Tan ZJ, et al. Effects of ultra-micro powder Qiweibaizhusan on metabolism diversity of intestinal microflora in diarrhea mice with dysbacteriosis[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2014, 20(1): 93-100 (in Chinese)  
张华玲, 蔡莹, 谭周进, 等. 超微七味白术散对菌群失调腹泻小鼠肠道微生物代谢多样性的影响[J]. *应用与环境生物学报*, 2014, 20(1): 93-100
- [8] Ministry of health P.R. China. Technical Standards for Testing & Assessment of Health Food[M]. Beijing, 2003: 148-153 (in Chinese)  
中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范[M]. 北京, 2003: 148-153
- [9] Chen LY, Guan XL, Zhang L, et al. Regulatory effect of Sojao Semen Praeparatum on 6 common gut microbes[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2017, 29(10): 1122-1126 (in Chinese)  
陈丽艳, 官雪莲, 张蕾, 等. 淡豆豉对人体肠道六种常驻菌的调节作用[J]. *中国微生态学杂志*, 2017, 29(10): 1122-1126
- [10] Hu XG. Study on exterior signs and related biological foundation of Qi-deficiency and blood-stasis[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Beijing University of Chinese Medicine, 2007 (in Chinese)  
扈新刚. 气虚血瘀大鼠模型表征及生物学基础相关研

- 究[D]. 北京: 北京中医药大学博士学位论文, 2007
- [11] Lou JL, Zhang YL, Zheng H, et al. Thinking train and method in research of animal model with syndrome of qi insufficiency and blood stasis[J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2006, 29(2): 87-90 (in Chinese)  
娄金丽, 张允岭, 郑宏, 等. 气虚血瘀证动物模型研究的思路与方法[J]. 北京中医药大学学报, 2006, 29(2): 87-90
- [12] Pang SL, Gao JL. Study on simulation and mechanism of qi deficiency and blood stasis syndrome in middle-aged rats[J]. Journal of Tianjin College of Traditional Chinese Medicine, 1997, 16(3): 28-30 (in Chinese)  
庞树玲, 高金亮. 中年大鼠气虚血瘀证的模拟及其机制探讨[J]. 天津中医学院学报, 1997, 16(3): 28-30
- [13] Piao SH, Hu YM, Guo J. A review on the method of establishing Qi deficiency and Blood stasis model[J]. Journal of Liaoning University of TCM, 2010, 12(11): 56-58 (in Chinese)  
朴胜华, 胡因铭, 郭姣. 气虚血瘀证动物模型造模方法研究评述[J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(11): 56-58
- [14] Hu XG, Zhang YL, Liu HS, et al. Research on the external signs and Hemorheology in rats with qi deficiency and blood stasis[J]. Tianjin Journal of Traditional Chinese Medicine, 2007, 24(2): 138-141 (in Chinese)  
扈新刚, 张允岭, 柳洪胜, 等. 气虚血瘀大鼠模型表征及血液流变学研究[J]. 天津中医药, 2007, 24(2): 138-141
- [15] Zhang YL, Zhang J, Hu XG, et al. Establishment of rat model of ischemic stroke with qi deficiency and blood stasis syndrome and its evaluation system[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2009, 29(4): 343-346 (in Chinese)  
张允岭, 张锦, 扈新刚, 等. 制作缺血性中风气虚血瘀证大鼠模型的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(4): 343-346
- [16] Zhang HY, Gao JZ, Zhang XH. Effect of Buyang Huanwu decoction on hemorheology in rats with qi deficiency and blood stasis syndrome[J]. Journal of Yunnan College of Traditional Chinese Medicine, 2000, 23(3): 10-11 (in Chinese)  
张红宇, 高菊珍, 张晓华. 补阳还五汤对气虚血瘀证大鼠血液流变学的影响[J]. 云南中医学院学报, 2000, 23(3): 10-11
- [17] Zhu CW, Peng K, Tong L. The effects of Bu Yang Huan Wu decoction on hemorheology and blood routine examination of ischemic stroke sequela model rats which lack of Qi and with blood stasis[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2007, 25(4): 706-709 (in Chinese)  
朱传武, 彭康, 佟丽. 补阳还五汤对中风后遗症气虚血瘀大鼠病理模型血常规及血液流变性的影响[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(4): 706-709
- [18] Tan ZJ, Wu H, Liu FL, et al. Effect of ultra-micro powder qiweibaishuan on the intestinal microbiota and enzyme activities in mice[J]. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(21): 6856-6863 (in Chinese)  
谭周进, 吴海, 刘富林, 等. 超微七味白术散对肠道微生物及酶活性的影响[J]. 生态学报, 2012, 32(21): 6856-6863
- [19] Cao Q, Steinman AD, Su XM, et al. Effects of microcystins contamination on soil enzyme activities and microbial community in two typical lakeside soils[J]. Environmental Pollution, 2017, 231: 134-142
- [20] Zhang HY, Li YJ, Gu JG, et al. On carbon metabolism of fungi in chlortetracycline degradation based on Biolog-FF system[J]. Microbiology China, 2015, 42(7): 1241-1247 (in Chinese)  
张惠艳, 李艳菊, 顾金刚, 等. 基于 Biolog-FF 技术的金霉素降解真菌的碳代谢特征研究[J]. 微生物学通报, 2015, 42(7): 1241-1247
- [21] Staddon WJ, Duchesne LC, Trevors JT. Microbial diversity and community structure of postdisturbance forest soils as determined by Sole-Carbon-Source utilization patterns[J]. Microbial Ecology, 1997, 34(2): 125-130
- [22] Han DX, Wang N, Wang NN, et al. Soil microbial functional diversity of different altitude *Pinus koraiensis* forests[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2015, 26(12): 3649-3656 (in Chinese)  
韩冬雪, 王宁, 王楠楠, 等. 不同海拔红松林土壤微生物功能多样性[J]. 应用生态学报, 2015, 26(12): 3649-3656
- [23] Garland JL. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1997, 24(4): 289-300
- [24] Jia X, Dong SM, Zhou CJ. Effects of Biolog Eco-plates incubation time on analysis results in microbial ecology researches[J]. Journal of Basic Science and Engineering, 2013, 21(1): 10-19 (in Chinese)  
贾夏, 董岁明, 周春娟. 微生物生态研究中 Biolog Eco 微平板培养时间对分析结果的影响[J]. 应用基础与工程科学学报, 2013, 21(1): 10-19
- [25] Jia LJ, Tang K, Lan HQ, et al. Diversity and structure of hypolithic bacteria community of Zhongyang Gobi[J]. Microbiology China, 2018, 45(12): 2603-2613 (in Chinese)  
贾丽娟, 唐凯, 兰慧青, 等. 中央戈壁石下生物土壤结皮中细菌群落结构和多样性[J]. 微生物学通报, 2018, 45(12): 2603-2613
- [26] Meng QJ, Xu YL, Li CJ, et al. Effects of different vegetation coverage on microbial functional diversity in black soil[J]. Chinese Journal of Ecology, 2008, 27(7): 1134-1140 (in Chinese)  
孟庆杰, 许艳丽, 李春杰, 等. 不同植被覆盖对黑土微生物功能多样性的影响[J]. 生态学报, 2008, 27(7): 1134-1140

- 1134-1140
- [27] Zhao L, Li LX, Chen FX, et al. Effect of *Bacillus subtilis* gavage on the intestinal microbiota of mice[J]. Journal of Shandong University (Health Sciences), 2017, 55(10): 28-35 (in Chinese)
- 赵力, 李理想, 陈飞雪, 等. 枯草芽孢杆菌灌胃对小鼠肠道菌群的影响[J]. 山东大学学报: 医学版, 2017, 55(10): 28-35
- [28] Chen WH, Yu ZL, Shi L, et al. Relationship between intestinal flora and neuropsychiatric diseases[J]. National Medical Journal of China, 2018, 98(29): 2320-2322 (in Chinese)
- 陈文浩, 于周龙, 师乐, 等. 肠道菌群与神经精神疾病[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(29): 2320-2322
- [29] Li HB, Wu SH, Zhang YY, et al. The research on interaction between traditional Chinese medicine and intestinal bacteria[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2016, 38(1): 147-151 (in Chinese)
- 李寒冰, 吴宿慧, 张颜语, 等. 中药与肠道菌相互作用研究进展[J]. 中成药, 2016, 38(1): 147-151
- [30] Tang YK, Yin WZ. Ecological view of traditional Chinese medicine and modern ecological medicine[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2008, 19(7): 1766-1768 (in Chinese)
- 唐由凯, 尹文仲. 中医学的生态观与现代生态医学[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(7): 1766-1768
- [31] Hu Y, Yang Q, Gan SL, et al. Fermentation characteristics of *Enterococcus hirae* and application in yogurt starter[J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2012, 35(1): 15-19 (in Chinese)
- 胡颖, 杨琴, 甘盛力, 等. 海氏肠球菌(*Enterococcus hirae*)发酵特性及应用[J]. 乳业科学与技术, 2012, 35(1): 15-19
- [32] Wang Q, Dai JL, Wu DQ, et al. Statistical analysis of data from Biolog method in the study of microbial ecology[J]. Acta Ecologica Sinica, 2010, 30(3): 817-823 (in Chinese)
- 王强, 戴九兰, 吴大千, 等. 微生物生态研究中基于 Biolog 方法的数据分析[J]. 生态学报, 2010, 30(3): 817-823
- [33] Shi P, Gao Q, Wang SP, et al. Effects of continuous cropping of corn and fertilization on soil microbial community functional diversity[J]. Acta Ecologica Sinica, 2010, 30(22): 6173-6182 (in Chinese)
- 时鹏, 高强, 王淑平, 等. 玉米连作及其施肥对土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 生态学报, 2010, 30(22): 6173-6182
- [34] Sun AR, Song W, Liu J, et al. Enzymatic production of arginine derivatives: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2018, 34(2): 165-176 (in Chinese)
- 孙安然, 宋伟, 刘佳, 等. 生物酶法合成 L-精氨酸衍生物的研究进展[J]. 生物工程学报, 2018, 34(2): 165-176
- [35] Wei J, Wang ZZ, Yu HB, et al. Construction and fermentation of L-threonine-producing recombinant *Escherichia coli*[J]. Microbiology China, 2019, 46(4): 695-706 (in Chinese)
- 魏佳, 王壮壮, 于海波, 等. 产 L-苏氨酸重组大肠杆菌的构建和发酵性能[J]. 微生物学通报, 2019, 46(4): 695-706