

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671-9638. 20257030

· 论 著 ·

丁酸钠促进四神丸调整肠道微生态治疗肾阳亏虚证泄泻的研究

狄嘉欣, 肖嫩群, 彭买姣, 谭周进

(湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208)

[摘要] **目的** 探讨丁酸钠和四神丸配伍对肾阳亏虚证泄泻小鼠的疗效, 为发挥经典方剂的现代应用提供试验依据。**方法** 采用腺嘌呤联合番泻叶灌胃, 建立肾阳亏虚证泄泻小鼠模型。灌胃给药 100% 四神丸水煎液、50 mg/kg 丁酸钠 + 75% 四神丸水煎液、100 mg/kg 丁酸钠 + 50% 四神丸水煎液、200 mg/kg 丁酸钠 + 25% 四神丸水煎液, 以及 300 mg/kg 丁酸钠, 比较分析小鼠一般体征、摄食饮水、肛温、体重、粪便含水率、脏器指数、肠道内容物菌群及酶活性。**结果** 治疗后小鼠精神状态、摄食饮水量、肛温以及粪便含水率逐渐恢复。自然恢复组、200 mg/kg 丁酸钠 + 25% 四神丸组和 50 mg/kg 丁酸钠 + 75% 四神丸组小鼠体重与正常组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 100 mg/kg 丁酸钠 + 50% 四神丸组小鼠体重 (34.23 ± 4.93)g 升高, 接近正常组小鼠体重 (35.69 ± 4.78)g。100 mg/kg 丁酸钠 + 50% 四神丸组小鼠脾脏指数恢复正常, 与自然恢复组小鼠比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。各组小鼠胸腺指数差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。治疗后, 小鼠肠道内菌群开始恢复, 细菌数各组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与自然恢复组相比, 各治疗组小鼠大肠埃希菌数显著降低 ($P < 0.01$), 100 mg/kg 丁酸钠 + 50% 四神丸组小鼠大肠埃希菌数最少; 100 mg/kg 丁酸钠 + 50% 四神丸组和 50 mg/kg 丁酸钠 + 75% 四神丸组小鼠双歧杆菌数量恢复至与正常组无差异 ($P > 0.05$); 100 mg/kg 丁酸钠 + 50% 四神丸组小鼠乳酸杆菌数量恢复显著 ($P < 0.05$)。自然恢复组小鼠淀粉酶、乳糖酶、蛋白酶活性均高于正常组 (均 $P < 0.05$), 100 mg/kg 丁酸钠 + 50% 四神丸组小鼠酶活性更接近正常组; 与自然恢复组相比, 100% 四神丸使小鼠乳糖酶活性显著降低 ($P < 0.01$), 100 mg/kg 丁酸钠 + 50% 四神丸组小鼠木聚糖酶活性与正常组最接近。**结论** 丁酸钠配伍促进四神丸疗效发挥, 100 mg/kg 丁酸钠 + 50% 四神丸组改善小鼠精神状态、泄泻症状、肠道内酶活性以及微生物稳态效果优于单独使用丁酸钠和四神丸。

[关键词] 丁酸钠; 肾阳亏虚证泄泻; 酶活性; 肠道微生态; 四神丸

[中图分类号] R256.34

Study on sodium butyrate enhancing the efficacy of Sishen pill in regulating intestinal microbiota for treating diarrhea with kidney-yang deficiency syndrome

DI Jiaxin, XIAO Nenqun, PENG Maijiao, TAN Zhoujin (School of Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective** To explore the synergistic therapeutic effect of sodium butyrate and Sishen pill on mice with diarrhea with kidney-yang deficiency syndrome, and provide experimental evidence for the contemporary application of classical prescriptions. **Methods** The diarrhea with kidney-yang deficiency syndrome mouse model was constructed by gavage of adenine combined with Folium sennae. Mice were given 100% Sishen pill decoction, 50 mg/kg sodium butyrate + 75% Sishen pill decoction, 100 mg/kg sodium butyrate + 50% Sishen pill decoction, 200 mg/kg sodium butyrate + 25% Sishen pill decoction, and 300 mg/mL sodium butyrate decoction by intragastric administration, respectively. General condition, food and water intake, anal temperature, body weight, fecal water content, organ index, intestinal microbiota, and enzyme activity of the mice were compared. **Results** After treatment, the

[收稿日期] 2024-09-25

[基金项目] 湖南省教育厅重点项目(24A0278)

[作者简介] 狄嘉欣(2001-), 女(汉族), 湖南省岳阳市人, 硕士研究生在读, 主要从事肠道微生态研究。

[通信作者] 谭周进 E-mail: tanzhjin@sohu.com

general condition, food and water intake, anal temperature, and fecal water content of the mice gradually recovered. The body weight of mice from the natural recovery group, the 200 mg/kg sodium butyrate + 25% Sishen pill group, and the 50 mg/kg sodium butyrate + 75% Sishen pill group still showed statistical differences from the normal group ($P < 0.05$). The body weight of mice from the 100 mg/kg sodium butyrate + 50% Sishen pill group (34.23 ± 4.93)g increased, close to the body weight of mice from the normal group (35.69 ± 4.78) g. Spleen index of the mice from the 100 mg/kg sodium butyrate + 50% Sishen pill group recovered to normal, showing significant difference from mice from the natural recovery group ($P < 0.05$). There were no significant differences in thymus index of mice from different groups ($P > 0.05$). After treatment, the mice intestinal microbiota began to recover, with no significant differences in the number of bacteria among groups ($P > 0.05$). Compared with the natural recovery group, the number of *Escherichia coli* in mice from each treatment group reduced significantly ($P < 0.01$), and the mice from 100 mg/kg sodium butyrate + 50% Sishen pill group had the smallest number of *Escherichia coli*. The number of *Bifidobacteria* in mice from the 100 mg/kg sodium butyrate + 50% Sishen pill group and the 50 mg/kg sodium butyrate + 75% Sishen pill group recovered to the level of the normal group ($P > 0.05$). The mice from 100 mg/kg sodium butyrate + 50% Sishen pill group showed a significant effect on the recovery of *Lactobacillus* number ($P < 0.05$). The amylase, lactase, and protease activities in mice from the natural recovery group were all higher than those from the normal group (all $P < 0.05$), and the enzyme activities in mice from the 100 mg/kg sodium butyrate + 50% Sishen pill group were closer to those from the normal group. Compared with the natural recovery group, lactase activity of mice from the 100% Sishen pill group reduced significantly ($P < 0.01$), and the xylanase activity in mice from the 100 mg/kg sodium butyrate + 50% Sishen pill group was closest to the normal group. **Conclusion** The synergistic effect of sodium butyrate enhances the therapeutic efficacy of Sishen pill. 100 mg/kg sodium butyrate + 50% Sishen pill group showed significant improvement in mice mental status, diarrhea symptoms, intestinal enzyme activity, and microbial stability compared with other groups using sodium butyrate or Sishen pill alone.

[Key words] sodium butyrate; diarrhea with kidney-yang deficiency syndrome; enzyme activity; intestinal microecology; Sishen pill

腹泻是一类全世界范围内常发的疾病,主要表现为每日多次排便,粪便不成型或水样便,严重腹泻可导致死亡。调查^[1-2]显示,腹泻死亡率随着儿童年龄的增长而下降,并在成年后保持相对稳定,是全球5岁以下儿童死亡的主要因素。根据病因、临床表现等,中医将腹泻分为不同证型,其中肾阳亏虚证泄泻较为常见且病因复杂^[3],因此,为提供更有效的治疗方式,研究此类疾病的治疗方法有重要意义。

课题组前期用腺嘌呤联合番泻叶灌胃小鼠,已成功建立肾阳亏虚证泄泻小鼠模型。肾阳亏虚证泄泻小鼠肠道内容物中的微生物和酶活性较正常小鼠有一定变化,其中,蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶和木聚糖酶等酶活性在造模后升高,细菌、乳酸杆菌和大肠埃希菌等在肠内容物中的数量也出现不同改变^[4]。四神丸作为治疗肾阳亏虚证泄泻的经典方剂,具有温肾健脾的作用,能促进肠黏膜损伤愈合,降低过度的炎症反应^[5];还能改善肾脏结构、能量代谢以及肠黏膜菌群的多样性^[6]。研究^[7]表明,四神丸不仅可以改善肠易激综合征(IBS)小鼠腹泻和腹痛的症状,还可以通过激活自噬、抑制内质网(ER)应激、促进黏液分泌来调节肠道屏障功能。作为中国传统方

剂,四神丸能根据患者不同症状加减药物配比,具有灵活且价格低廉的优点。然而,传统中药单方疗效欠佳,临床上常与其他方剂合用,或与西医治疗协同互补提高疗效。药物可通过影响短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFAs)在肠道内的产生来治疗肠道疾病:四神丸治疗后的腹泻小鼠肠道内容物中 SCFAs 水平发生变化,丙酸、丁酸、异丁酸和异戊酸增多,乙酸、戊酸水平下降^[8]。葛根芩连汤(GQD)通过增加 SCFAs 的水平减轻仔猪的肠黏膜炎症和腹泻^[9]。因此,考虑将经典方剂四神丸与 SCFAs 联合使用治疗肾阳亏虚证泄泻。

SCFAs 是一类由肠道中膳食纤维代谢产生的有机酸,既可以作为机体能量的来源,在治疗腹泻、维持肠道菌群稳态方面也具有重要作用^[10]。SCFAs 可通过改善肠道能量代谢,维护肠黏膜屏障功能和促进肠道电解质和水的吸收来改善腹泻^[11]。丁酸钠作为短链脂肪酸盐的一种,可影响机体的免疫、炎症反应,同时也能调节机体的消化能力和血液代谢,其在维持肠道健康方面至关重要^[12]。丁酸钠可通过多种途径治疗肠道疾病,如调节肠道菌群,抑制肠道炎症以减轻小鼠结肠炎^[13];提高肠道内淋巴细胞

(IEL)和免疫球蛋白 A(IgA) + 细胞以及双歧杆菌的数量,增强肠黏膜的免疫功能^[14]。此外,丁酸钠作为理想的生长促进剂可对机体内蛋白酶、淀粉酶等酶活性产生影响^[15]。然而,丁酸钠的用量也需关注,过量丁酸钠可能会诱发细胞凋亡,也可能对机体产生可逆的毒性作用^[16-17]。研究^[18]表明,丁酸钠药物浓度在 100~400 mg/kg 范围内疗效最好,可减轻肠炎小鼠中性粒细胞的浸润程度,改善葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的肠炎小鼠的结肠缩短程度,当给药浓度>500 mg/kg 时,反而加重小鼠结肠损伤。因此,本研究使用课题组前期小鼠模型,在观察小鼠一般体征的同时评估其肠道微生物活性和酶活性,定量肠道微生物菌落,探讨丁酸钠与四神丸的各配伍组合对肾阳亏虚证泄泻小鼠的疗效,旨在选择合适的组合,为四神丸治疗肾阳亏虚证泄泻提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物及饲养环境 70 只体重为 18~22 g 的 SPF 级雄性昆明小鼠,购于湖南斯莱克信达实验动物有限公司[许可证号:SCXK(湘)2019-0004]。小鼠均饲养于湖南中医药大学动物实验中心[实验单位许可证编号:SYXK(湘)2019-0009]。湖南中医药大学动物伦理委员会动物伦理批准编号为 HNUCM21-2403-43。

1.1.2 试验药物及制备 腺嘌呤(德国 biofrox,批号:EZ7890C450)。腺嘌呤混悬液制备方法:用无菌水将腺嘌呤配置成 5 mg/mL 的混悬液,每日现配现用,避光保存。番泻叶(亳州市沪谯药业有限公司,批号 2111090022)。番泻叶水煎液制备:取番泻叶浸泡后于水浴锅中加热,过滤后浓缩成含生药 1 g/mL 番泻叶水煎液,4℃ 保存备用。

四神丸方剂:补骨脂(盐)12 g,肉豆蔻(煨)6 g,吴茱萸(制)3 g,五味子(醋制)6 g,大枣(去核)6 g,生姜 6 g,批号分别为 231001(湖南君吴中药饮片科贸有限公司)、23083107(湖南衡岳中药饮片有限公司)、230801(湖南荣康中药饮片有限公司)、A231031(亳州市永刚饮片厂有限公司)、2310001(湖南新参芝林中药饮片有限公司)。按照配方比例称取药物,在 300 mL 水中浸泡 30 min,煮沸,后转文火煎煮 30 min,用纱布过滤药液。剩余药渣用 200 mL 水按相同程序煎煮,过滤后,将两次药液混

合,浓缩成含生药 0.29 g/mL 的四神丸水煎液^[19]。按不同比例将四神丸和丁酸钠(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:I2313563)配伍组合。

1.2 方法

1.2.1 造模 适应性喂养 4 d 后,70 只小鼠按随机数表法分为正常组(NC 组)10 只,模型组 60 只。腺嘌呤联合番泻叶水煎液造小鼠肾阳亏虚证泄泻模型^[17]。造模共计 14 d,模型组给予腺嘌呤混悬液[50 mg/(kg·d),0.4 mL/只,1 次/d]连续灌胃 14 d,从第 8 天开始,给番泻叶水煎剂[10 g/(kg·d),0.4 mL/只,1 次/d],连续给药 7 d。NC 组等频率予等体积无菌水灌胃。

1.2.2 分组与给药方法 造模 14 d 后,停止造模因素,剔除不符合模型评价的小鼠,保留每组 6 只。模型组随机分为自然恢复(NM)组、100%四神丸(SSP)组、50 mg/kg 丁酸钠 + 75%四神丸(LB-HP)组、100 mg/kg 丁酸钠 + 50%四神丸(MBMP)组、200 mg/kg 丁酸钠 + 25%四神丸(HBLP)组、300 mg/kg 丁酸钠(SB)组进行治疗。SSP 组灌胃四神丸水煎剂[5 g/(kg·d),0.35 mL/只,2 次/d],连续 7 d;其他组灌胃相同次数和体积对应药液;NC 组和 NM 组灌胃相同次数和体积的无菌水。四神丸灌胃剂量参考课题组前期论文^[19]。

1.2.3 模型评价标准 基于肾阳亏虚证泄泻的临床表现,建立模型的评价指标:通过测量小鼠肛温、行为学变化来反映四肢冰凉、体温下降以及精神萎靡的症状;通过测定小鼠粪便含水率反映腹泻程度;通过测量体重及摄食量来反映体重减轻及食欲不振^[20]。

1.2.4 肛温、体重、饮食饮水量、粪便含水率的测定 在试验的第 1、7、14、17 和 21 天测量小鼠肛温、体重,并在试验的第 1、7、10、14、17、21 天收集小鼠新鲜粪便,记录粪便湿重后,110℃ 烘干至恒重并称其重量,记录小鼠摄食量及饮水量。粪便含水率 = (粪便湿重 - 粪便干重) / 粪便湿重 × 100%

1.2.5 脏器指数测定 取小鼠完整脾、胸腺,除去多余脂肪组织后用滤纸吸干表面血液,并称量。

脏器指数 = 脏器质量(g) / 体重(g) × 100%

1.2.6 微生物培养 无菌操作取小鼠空肠至回肠段内容物,按比例加入无菌水后(样品:无菌水 = 3:50),振荡摇匀 30 min 以完全释放肠道内容物中的微生物。细菌在牛肉膏 - 蛋白胨琼脂培养基中培养,大肠埃希菌在伊红美蓝琼脂培养基(EMB)中培养,双歧杆菌在双歧杆菌琼脂培养基中培养,乳酸杆

菌在 DeMan-Rogosa-Sharp 琼脂培养基中培养。以稀释平板法对微生物菌落进行计数,计算每克肠道内容物的菌落数。细菌和大肠埃希菌 37℃ 恒温培养 24 h 后计数,双歧杆菌和乳酸杆菌 37℃ 恒温厌氧培养 48 h 后计数^[21]。

1.2.7 微生物活度测定 二乙酸荧光素(FDA)被细菌和真菌中非特异性酶催化水解,释放出可通过分光光度法测量的有色产物荧光素。该水解酶活性在一定程度上可以反映肠道微生物的代谢能力^[22]。按 1.2.5 小结方法得到内容物与无菌水的混合物后,3 000 r/min 离心 15 min 收集上清液为粗酶液。FDA 储备液:2 mg FDA 中加入 1 mL 丙酮制备成 2 mg/mL FDA 储备液,避光于 -20℃ 保存。吸取 FDA 储备液加入至磷酸盐缓冲液(PBS)中(A 液),使 FDA 反应液终浓度为 10 μg/mL。试管中依次加入 2 mL A 液、10 μL 粗酶液,振荡摇匀后加 2 mL 丙酮终止反应;空白组依次加入 2 mL A 液、10 μL 粗酶液和 2 mL 丙酮后振荡摇匀。振荡摇匀条件:24℃ 摇床 90 min。反应结束后,用紫外-可见分光光度计于 490 nm 波长测定吸光度^[23]。

1.2.8 酶活性测定 用紫外-可见分光光度计测量粗酶液中酶活性。淀粉酶采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法在 520 nm 波长下测定吸光值;蛋白酶采用福林酚法在 660 nm 波长下测定吸光值;乳糖酶采用邻硝基苯 β-D-半乳糖苷(ONPG)法在 420 nm 波长下测定吸光值;木聚糖酶采用 DNS 法

在 550 nm 波长下测定吸光值^[24]。

1.3 统计分析 应用 SPSS 25.0 进行统计分析,各组定量资料用均数±标准差表示。若多组间数据均符合正态分布和方差齐性,则采用单因素方差分析,否则采用 *Kruskal-Wallis H* 检验。 $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠造模和治疗阶段一般体征、平均摄食量、平均饮水量变化 腺嘌呤灌胃后,小鼠开始出现蜷缩抱团行为;灌胃番泻叶后,出现明显的腹泻症状,部分小鼠肛周区域有粪便粘黏,垫料潮湿且发臭。小鼠精神状态不佳,毛发稀疏、黯淡。此外,与 NC 组相比,各模型组小鼠平均摄食量略降低,饮水量明显增加。

治疗期间,小鼠摄食量开始增长,NM 组在后期增幅较缓,SB 组和 LBHP 组增长幅度接近 NC 组,HBLP 组、MBMP 组和 SSP 组增长较快;各组平均饮水量恢复,与 NM 组相比,治疗组饮水量降低明显,逐渐向 NC 组靠近。治疗后的小鼠肛周洁净程度、毛发光泽度、精神状态恢复,但 NM 组仍存在小鼠肛周潮湿,且垫料干燥程度不如其余治疗组的情况。这提示四神丸、丁酸钠和不同配伍组合的丁酸钠与四神丸对改善小鼠肾阳亏虚证泄泻相关症状有一定的效果。见图 1。

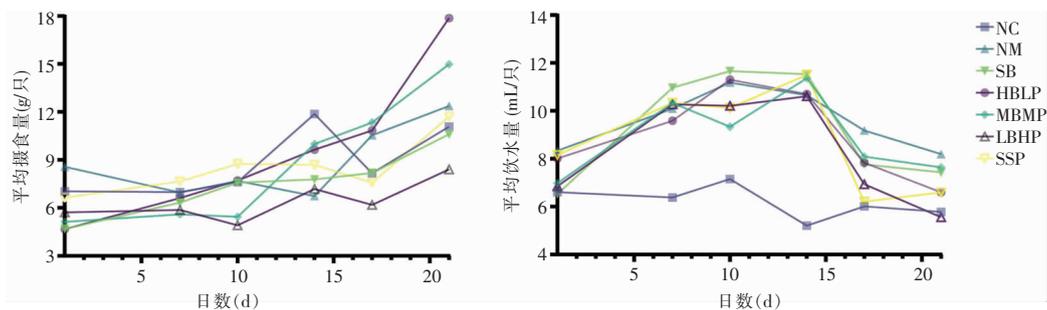
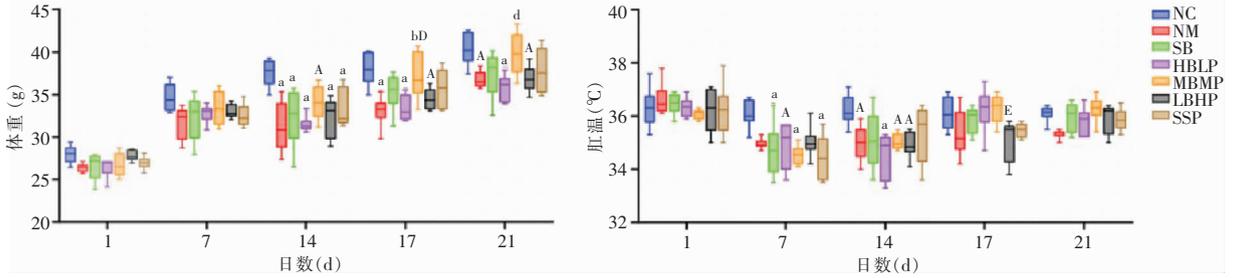


图 1 丁酸钠与四神丸配伍对小鼠平均摄食量和平均饮水量的影响

Figure 1 Synergistic effect of sodium butyrate and Sishen pill on average food intake and average water intake in mice

2.2 小鼠造模和治疗阶段体重、肛温变化 第 14 天造模结束时,各模型组小鼠体重低于 NC 组($P < 0.05$),肛温也呈下降趋势。治疗阶段各组小鼠体重和肛温开始恢复,第 17 d,SB 组、MBMP 组和 SSP 组小鼠体重恢复至与 NC 组无显著性差异(均

$P > 0.05$)。第 21 d,NM 组、LBHP 组与 NC 组比较,差异仍均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。MBMP 组小鼠体重(34.23 ± 4.93)g 更接近 NC 组体重(35.69 ± 4.78)g。见图 2。

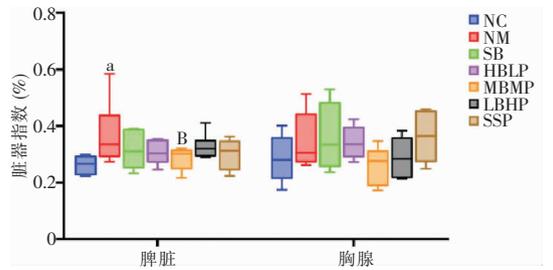


注：与 NC 组比较，A 代表 $P < 0.05$ ，a 代表 $P < 0.01$ ；与 NM 组比较，b 代表 $P < 0.01$ ；与 HBLP 组比较，D 代表 $P < 0.05$ ，d 代表 $P < 0.01$ ；与 MBMP 组比较，E 代表 $P < 0.05$ 。

图 2 丁酸钠与四神丸配伍对小鼠体重和肛温的影响 ($n = 6$)

Figure 2 Synergistic effect of sodium butyrate and Sishen pill on weight and anal temperature in mice ($n = 6$)

2.3 小鼠造模和治疗阶段粪便性状变化 灌胃番泻叶后第三天，小鼠出现软便、腹泻的情况：粪便颜色变淡，易被镊子夹取变形，在滤纸上按压有明显的渍印，粪便含水量急剧升高，而 NC 组稳定。停止造模开始治疗后，小鼠粪便含水量逐渐降低，MBMP 组降低明显，更接近 NC 组，粪便颜色恢复正常，在滤纸上按压渍印消失，提示 100 mg/kg 丁酸钠 + 50% 四神丸的配伍组合可能对肾阳亏虚证泄泻腹泻症状的改善效果更好。见图 3。



注：与 NC 组比较，a 代表 $P < 0.01$ ；与 NM 组比较，B 代表 $P < 0.05$ 。

图 4 丁酸钠与四神丸配伍对小鼠脏器指数的影响 ($n = 6$)

Figure 4 Synergistic effect of sodium butyrate and Sishen pill on organ index in mice ($n = 6$)

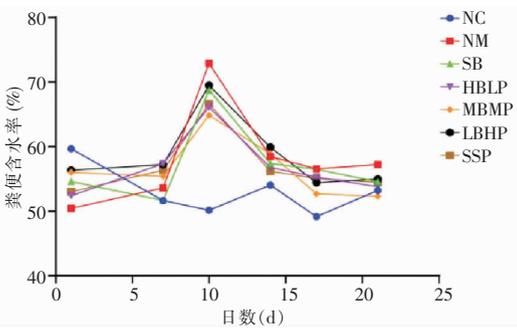


图 3 丁酸钠与四神丸配伍对小鼠粪便含水率的影响

Figure 3 Synergistic effect of sodium butyrate and Sishen pill on fecal water content in mice

2.4 丁酸钠与四神丸配伍对肾阳亏虚证泄泻小鼠脏器指数的影响 与 NC 组相比，NM 组小鼠脾脏指数升高 ($P = 0.006$)，其余治疗组与 NC 组接近 ($P < 0.05$)；MBMP 组与 NM 组小鼠脾脏指数比较，差异有统计学意义 ($P = 0.027$)。与 NM 组小鼠相比，MBMP 组和 LBHP 组小鼠胸腺指数呈下降趋势，但各组小鼠胸腺指数差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。见图 4。

2.5 丁酸钠与四神丸配伍对肾阳亏虚证泄泻小鼠肠道可培养菌落数的影响 肾阳亏虚证泄泻小鼠肠道内容物中菌群发生改变，NM 组小鼠细菌数大于

NC 组，但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，大肠埃希菌数显著增加 ($P < 0.01$)，双歧杆菌和乳酸杆菌数减少 (均 $P < 0.01$)。各治疗组中，小鼠细菌数量随四神丸比例升高而降低，大肠埃希菌数 MBMP 组最低，乳酸杆菌数在治疗后也开始恢复，其中 MBMP 组中最高。与 NC 组相比，除 HBLP 组外，添加丁酸钠的治疗组小鼠双歧杆菌数恢复更明显，恢复至与 NC 组无显著差异 ($P > 0.05$)，且双歧杆菌数在 LBHP 组中最大。由此推断，100 mg/kg 丁酸钠 + 50% 四神丸对肾阳亏虚证泄泻小鼠肠道可培养菌落数调控效果可能最好，50 mg/kg 丁酸钠 + 75% 四神丸次之。见表 1。

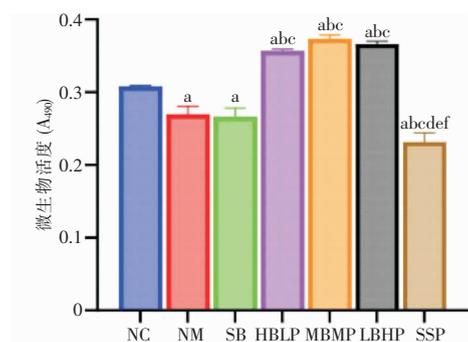
2.6 丁酸钠与四神丸配伍对肾阳亏虚证泄泻小鼠肠道内容物微生物活度的影响 NM 组小鼠微生物活度较 NC 组降低 ($P < 0.01$)。HBLP 组、MBMP 组、LBHP 组小鼠微生物活度升高 ($P < 0.01$)，说明肾阳亏虚证泄泻小鼠的肠道微生物代谢能力下降，经治疗后恢复，提示各配伍组疗效较单用四神丸和丁酸钠可能更好。见图 5。

表 1 丁酸钠与四神丸配伍对小鼠肠道内可培养菌落数的影响($\bar{x} \pm s, \text{CFU/g}, n = 3$)

Table 1 Synergistic effect of sodium butyrate and Sishen pill on the number of intestinal culturable colonies in mice ($\bar{x} \pm s, \text{CFU/g}, n = 3$)

组别	细菌($\times 10^8$)	大肠埃希菌($\times 10^5$)	双歧杆菌($\times 10^8$)	乳酸杆菌($\times 10^8$)
NC	1.590 ± 1.334	1.979 ± 0.308	10.601 ± 1.767	5.595 ± 1.743
NM	2.019 ± 0.662	5.720 ± 0.064 ^a	3.671 ± 1.836 ^A	1.224 ± 0.280 ^a
SB	2.486 ± 0.774	3.369 ± 0.107 ^b	4.144 ± 2.713	3.078 ± 1.531 ^A
HBLP	1.885 ± 0.714	2.579 ± 0.868 ^b	3.534 ± 1.767 ^A	1.826 ± 0.735 ^a
MBMP	1.451 ± 0.725	1.272 ± 0.122 ^{bCd}	5.806 ± 2.661	3.948 ± 2.019 ^B
LBHP	1.413 ± 0.468	3.344 ± 1.354 ^b	6.900 ± 1.523	3.297 ± 0.973 ^A
SSP	0.474 ± 0.370	1.310 ± 0.027 ^{bCf}	2.371 ± 2.716 ^a	2.015 ± 0.673 ^a
F	1.967	18.610	4.779	4.035
P	0.140	<0.001	0.008	0.010

注:与 NC 组比较,A 代表 $P < 0.05$,a 代表 $P < 0.01$;与 NM 组比较,B 代表 $P < 0.05$,b 代表 $P < 0.01$;与 SB 组比较,C 代表 $P < 0.05$;与 HBLP 组比较,d 代表 $P < 0.01$;与 LBHP 组比较,f 代表 $P < 0.01$ 。



注:与 NC 组比较,a 代表 $P < 0.01$;与 NM 组比较,b 代表 $P < 0.01$;与 SB 组比较,c 代表 $P < 0.01$;与 HBLP 组比较,d 代表 $P < 0.01$;与 MBMP 组比较,e 代表 $P < 0.01$;与 LBHP 组比较,f 代表 $P < 0.01$ 。

图 5 丁酸钠与四神丸配伍对小鼠肠道内微生物活度的变化 ($n = 3$)

Figure 5 Synergistic effect of sodium butyrate and Sishen pill on intestinal microbial activity in mice ($n = 3$)

表 2 丁酸钠与四神丸配伍对小鼠肠道酶活性的影响(U/g, $n = 3$)

Table 2 Synergistic effect of sodium butyrate and Sishen pill on intestinal enzyme activity in mice (U/g, $n = 3$)

组别	淀粉酶[M(P_{25}, P_{75})]	乳糖酶[M(P_{25}, P_{75})]	蛋白酶($\bar{x} \pm s$)	木聚糖酶($\bar{x} \pm s$)
NC	0.940(0.713, 0.940)	1.955(1.852, 1.967)	0.343 ± 0.159	0.063 ± 0.020
NM	1.610(1.149, 2.070) ^A	2.251(2.217, 2.272) ^A	0.684 ± 0.147 ^a	0.241 ± 0.198
SB	0.865(0.854, 1.096)	1.851(1.847, 1.959)	0.486 ± 0.097	0.544 ± 0.213 ^a
HBLP	1.344(1.249, 1.350)	2.412(2.407, 2.422) ^{AC}	0.192 ± 0.065 ^b	0.150 ± 0.067 ^C
MBMP	1.297(1.204, 1.360)	2.138(2.128, 2.143)	0.152 ± 0.110 ^{bC}	0.067 ± 0.031 ^c
LBHP	1.709(1.637, 1.732)	2.049(2.049, 2.057) ^D	0.158 ± 0.104 ^{bC}	0.229 ± 0.030
SSP	1.522(1.251, 1.546)	0.836(0.833, 0.852) ^{bDE}	0.199 ± 0.156 ^b	0.086 ± 0.017 ^c
H/F	16.180 [*]	18.783 [*]	10.410	6.621
P	0.013	0.005	<0.001	0.002

注:与 NC 组比较,A 代表 $P < 0.05$,a 代表 $P < 0.01$;与 NM 组比较,b 代表 $P < 0.01$;与 SB 组比较,C 代表 $P < 0.05$,c 代表 $P < 0.01$;与 HBLP 组比较,D 代表 $P < 0.05$,d 代表 $P < 0.01$;与 MBMP 组比较,E 代表 $P < 0.05$ 。* 表示为 H 值。

2.7 丁酸钠与四神丸配伍对肾阳亏虚证泄泻小鼠肠道内容物酶活性的影响 与 NC 组相比,NM 组小鼠肠道内容物中淀粉酶活性、乳糖酶活性、蛋白酶活性升高(均 $P < 0.05$)。除 LBHP 组外,各治疗组淀粉酶活性有下降趋势;除 HBLP 组外,各治疗组乳糖酶活性也存在下降趋势;与 NM 组比较,蛋白酶活性除 SB 组外均显著降低(均 $P < 0.01$),其中 MBMP 组蛋白酶活性最低。NM 组小鼠木聚糖活性较 NC 组升高,MBMP 组木聚糖活性在数值上接近 NC 组。由此可知,肾阳亏虚证泄泻小鼠肠道内容物酶活性出现了一定程度的改变,而丁酸配伍四神丸能够改善肾阳亏虚证泄泻对小鼠肠道内容物酶的影响。见表 2。

3 讨论

肾阳是全身阳气的根本,肾阳不足会导致脏腑经络失于温养,气血运行无力,从而出现面无光泽,精神萎靡,体温下降,畏寒怕冷等病态体征。根据该体征,本研究记录小鼠摄食饮水量、肛温、体重、粪便含水量及脏器指数,结果显示,与 NM 组相比,各治疗组干预后小鼠饮食饮水恢复更为迅速,每组各有优势。各组小鼠肛温均恢复至与 NC 组差异无统计学意义(均 $P > 0.05$),SB 组、MBMP 组及 LBHP 组小鼠肛温在数值上与 NC 组接近。SB 组、MBMP 组和 SSP 组小鼠体重恢复至 NC 组水平,仅 NM 组与 NC 组差异有统计学意义($P < 0.05$)。MBMP 组和 HBLP 组治疗后,小鼠粪便含水率降低迅速。这说明丁酸钠和四神丸以及他们配伍组合均能改善小鼠肾阳亏虚证泄泻症状,其中 MBMP 组优势更为明显。脏器受到损伤时会出现水肿、充血等病理形态变化,脏器指数随脏器质量的变化而改变,是毒理评价常用的指标,可反映机体免疫水平变化,但存在一定滞后性^[25]。各组小鼠胸腺指数差异虽无统计学意义,并不意味着不同治疗方案对小鼠免疫功能无影响,应结合其他结果进行讨论分析。

人体肠道内存在数量庞大且复杂的微生物菌群。正常稳定的肠道菌群对维持宿主健康有重要意义,在塑造肠道免疫系统、增加代谢、为宿主提供营养物质等方面发挥着核心作用。中药能改变肠道菌群群落组成,进一步影响菌群代谢物,如肠道中的酶。同时,肠道菌群及酶也可以对中药成分进行转化吸收利用^[26]。本研究中,丁酸钠、四神丸及不同配伍组治疗提升了乳酸杆菌和双歧杆菌在小鼠肠内容物中的数量,减少了大肠埃希菌数量和细菌总数,恢复了肾阳亏虚证泄泻小鼠的肠道稳态。大肠埃希菌作为人和动物肠道内的正常定植菌,在肠道微生态平衡时无害,当疾病发生,肠道微生态失衡,肠致病性大肠埃希菌数量就会增加。研究^[27]表明,肠致病性大肠埃希菌作为腹泻的病原体,可引起儿童出现水样便,降低抗菌免疫水平。双歧杆菌和乳酸杆菌作为益生菌,可以改善肠道上皮细胞的完整性,并有一定抗炎作用。喂食乳酸杆菌和双歧杆菌的小鼠肠道微生物组发生显著变化,其改变对小鼠健康具有积极影响^[28]。各治疗组小鼠大肠埃希菌数量均显著下降(均 $P < 0.01$),大肠埃希菌数量在 MBMP 组和 SSP 组中更低。SB 组、MBMP 组和 LBHP 组

治疗促进了小鼠肠道双歧杆菌的增殖,使其恢复至正常水平。100 mg/kg 丁酸钠 + 50% 四神丸更有利于乳酸杆菌在肠道中定植。这提示治疗对恢复小鼠肠道免疫水平有一定益处,且 MBMP 组在平衡肠道菌群方面存在一定优势。

胃肠道系统中微生物会产生和分泌酶,酶通过降解脂肪、蛋白质和碳水化合物来完成营养物质的消化和吸收^[29]。酶的补充可以治疗许多肠道疾病,反过来也可以通过检测机体肠道内酶活性的检测来判断药物对疾病的疗效。然而,酶不是越多越好,有些酶的上调也可能提示潜在的健康问题。肠道蛋白酶介导消化和免疫的信号传导,其活性增加会导致肠道屏障的破坏和内脏超敏反应^[30]。粪便蛋白酶活性可作为疾病发生的标志物。研究^[31]显示,IBS 患者由于粪便的蛋白酶水解活性增加,导致结肠通透性增加,使用丝氨酸蛋白酶抑制剂后可有效阻断蛋白酶对屏障的影响。同时,丝氨酸蛋白酶抑制剂还能使蛋白酶活性增加的 IBS 大鼠内脏超敏反应得到改善^[32]。本研究中,治疗后小鼠内容物蛋白酶活性降低,除 SB 组外,各组与 NM 组间均有差异(均 $P < 0.01$)。这说明丁酸钠与四神丸的配伍能有效改变其酶活性,避免酶活性过高对肠道屏障及脏器产生损伤。其中,MBMP 组蛋白酶活性最低,这可使酶适时地在特定部位和环境中发挥其作用,保证体内代谢的正常进行。

综上所述,短链脂肪酸盐丁酸钠和经典方剂四神丸配伍,对治疗肾阳亏虚证泄泻有一定的积极意义,其中以 100 mg/kg 丁酸钠 + 50% 四神丸比例的治疗组恢复更为明显,改善了小鼠精神状态及泄泻症状,同时也恢复了小鼠肠道内酶活性及微生物稳态。此研究在探寻四神丸治疗肾阳亏虚证泄泻的同时还能减少中药用量,即促进四神丸疗效的同时减轻了中药毒性成分对机体的损伤。但从这些方面评价疗效仍显不足,还需深入探究该配伍组合治疗肾阳亏虚证泄泻的具体机制,如通过测序精准检测肠道菌群结构是否改变,或是否通过影响肠道中某种特定的菌及其代谢物来改变肠菌稳态从而影响疾病恢复进程。此外,后续还可通过细胞试验确定药物治疗疾病的具体通路,从宏观到微观,更加清晰地探明作用机制。因此该配伍组合是否能作为治疗肾阳亏虚证泄泻小鼠最合适的组合仍需进一步研究。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

[参 考 文 献]

- [1] Khan AI, Amin MA. Understanding deaths from diarrhoea in children younger than 5 years[J]. Lancet Glob Health, 2024, 12(6): e891 - e892.
- [2] Walker CLF, Black RE. Diarrhoea morbidity and mortality in older children, adolescents, and adults[J]. Epidemiol Infect, 2010, 138(9): 1215 - 1226.
- [3] 李玉丽, 袁振仪, 谭周进. 泄泻证候相关肠道菌群的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(16): 209 - 217.
Li YL, Yuan ZY, Tan ZJ. Correlation between intestinal flora and traditional Chinese medicine syndromes of diarrhea: a review[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2021, 27(16): 209 - 217.
- [4] Zhou MS, Li XY, Liu J, et al. Adenine's impact on mice's gut and kidney varies with the dosage administered and relates to intestinal microorganisms and enzyme activities[J]. Biotech, 2024, 14(3): 88.
- [5] 程敬, 吕尚斌, 张怡, 等. 温肾健脾法治疗缓解期溃疡性结肠炎的研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(2): 927 - 932.
Cheng J, Lv SB, Zhang Y, et al. Research progress of warming the kidney and strengthening the spleen in the treatment of remission ulcerative colitis[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2022, 37(2): 927 - 932.
- [6] Zhu JY, Li XY, Deng N, et al. Intestinal mucosal flora of the intestine-kidney remediation process of diarrhea with deficiency kidney-yang syndrome in Sishen pill treatment: Association with interactions between *Lactobacillus johnsonii*, Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP-ase, and Na^{+} - K^{+} -ATP-ase[J]. Heliyon, 2023, 9(5): e16166.
- [7] Zhao YC, Zhan JG, Sun CY, et al. Sishen wan enhances intestinal barrier function via regulating endoplasmic reticulum stress to improve mice with diarrheal irritable bowel syndrome[J]. Phytomedicine, 2024, 129: 155541.
- [8] Li XY, Qiao B, Wu YY, et al. Sishen pill inhibits intestinal inflammation in diarrhea mice via regulating kidney-intestinal bacteria-metabolic pathway[J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1360589.
- [9] Liu CS, Liang X, Wei XH, et al. Gegen Qinlian decoction treats diarrhea in piglets by modulating gut microbiota and short-chain fatty acids[J]. Front Microbiol, 2019, 10: 825.
- [10] Mansuy-Aubert V, Ravussin Y. Short chain fatty acids: the messengers from down below[J]. Front Neurosci, 2023, 17: 1197759.
- [11] 舒雁, 惠华英, 谭周进. 肠道短链脂肪酸与腹泻的相关性研究进展[J]. 中国感染控制杂志, 2022, 21(9): 937 - 943.
Shu Y, Hui HY, Tan ZJ. Advances in correlation between short-chain fatty acids and diarrhea[J]. Chinese Journal of Infection Control, 2022, 21(9): 937 - 943.
- [12] 狄嘉欣, 郭梅芳, 肖嫩群, 等. 肠道丁酸的研究进展[J]. 中国感染控制杂志, 2024, 23(9): 1192 - 1198.
Di JX, Guo MF, Xiao NQ, et al. Research progress of intestinal butyric acid[J]. Chinese Journal of Infection Control, 2024, 23(9): 1192 - 1198.
- [13] Dou XJ, Gao N, Yan D, et al. Sodium butyrate alleviates mouse colitis by regulating gut microbiota dysbiosis[J]. Animals (Basel), 2020, 10(7): 1154.
- [14] Luo D, Li JL, Xing T, et al. Combined effects of xylo-oligosaccharides and coated sodium butyrate on growth performance, immune function, and intestinal physical barrier function of broilers[J]. Anim Sci J, 2021, 92(1): e13545.
- [15] Zhao HX, Wang GX, Wang HR, et al. Effects of dietary sodium butyrate on growth, digestive enzymes, body composition and nutrient retention-related gene expression of juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. Anim Nutr, 2021, 7(2): 539 - 547.
- [16] Rosser EC, Piper CJM, Matei DE, et al. Microbiota-derived metabolites suppress arthritis by amplifying aryl-hydrocarbon receptor activation in regulatory B cells[J]. Cell Metab, 2020, 31(4): 837 - 851. e10.
- [17] Xu YH, Peng SQ, Cao XY, et al. High doses of butyrate induce a reversible body temperature drop through transient proton leak in mitochondria of brain neurons[J]. Life Sci, 2021, 278: 119614.
- [18] 徐豪明. 丁酸在粪菌移植治疗溃疡性结肠炎中的作用及机制研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2021.
Xu HM. The role and mechanism of butyric acid in the treatment of ulcerative colitis by fecal microbiota transplantation [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2021.
- [19] 李小雅, 朱佳源, 吴仪, 等. 泄泻肾阳亏虚证小鼠模型的建立与验证[J]. 中医杂志, 2022, 63(14): 1368 - 1373.
Li XY, Zhu JY, Wu Y, et al. Model building and validation of diarrhea mice with kidney-yang depletion syndrome[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2022, 63(14): 1368 - 1373.
- [20] Zhu JY, Li XY, Deng N, et al. Diarrhea with deficiency kidney-yang syndrome caused by adenine combined with Folium senna was associated with gut mucosal microbiota[J]. Front Microbiol, 2022, 13: 1007609.
- [21] Qiao B, Li XY, Zheng T, et al. Different effects of lard and vegetable blend oil on intestinal microorganisms, enzyme activity and blood routine in mice[J]. J Oleo Sci, 2022, 71(2): 301 - 310.
- [22] Guo KX, Yan YW, Zeng CF, et al. Study on Baohe pills regulating intestinal microecology and treating diarrhea of high-fat and high-protein diet mice[J]. Biomed Res Int, 2022, 2022: 6891179.
- [23] Li CR, Xiao NQ, Deng N, et al. Dose of sucrose affects the efficacy of Qiweibaizhu powder on antibiotic-associated diarrhea: association with intestinal mucosal microbiota, short-chain fatty acids, IL-17, and MUC2[J]. Front Microbiol, 2023, 14: 1108398.

- [24] 谢果珍, 唐圆, 吴仪, 等. 七味白术散总苷对菌群失调腹泻小鼠肠道微生物及酶活性的影响[J]. 生物技术通报, 2021, 37(12): 124-131.
Xie GZ, Tang Y, Wu Y, et al. Effects of total glycosides of Qiwei Baizhu Powder on intestinal microbiota and enzyme activities in diarrhea mice[J]. Biotechnology Bulletin, 2021, 37(12): 124-131.
- [25] 李翠茹, 谭周进, 郑淘, 等. 甜味剂对七味白术散治疗抗生素相关性腹泻小鼠肠道微生物及酶活性的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2023, 35(5): 504-509.
Li CR, Tan ZJ, Zheng T, et al. Effects of sweeteners on intestinal microorganisms and enzymatic activities in mice with antibiotic-associated diarrhea treated with Qiwei Baizhu Powder[J]. Chinese Journal of Microecology, 2023, 35(5): 504-509.
- [26] Zhou YC, Zhang DD, Cheng H, et al. Repairing gut barrier by traditional Chinese medicine: roles of gut microbiota[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2024, 14: 1389925.
- [27] Buskirk AD, Ndungo E, Shimanovich AA, et al. Mucosal immune profiles associated with diarrheal disease severity in *Shigella*- and enteropathogenic *Escherichia coli*-infected children enrolled in the global enteric multicenter study[J]. mBio, 2022, 13(4): e0053822.
- [28] Gryaznova M, Dvoretzkaya Y, Burakova I, et al. Dynamics of changes in the gut microbiota of healthy mice fed with lactic acid bacteria and bifidobacteria[J]. Microorganisms, 2022, 10(5): 1020.
- [29] Passos AA, Moita VHC, Kim SW. Individual or combinational use of phytase, protease, and xylanase for the impacts on

total tract digestibility of corn, soybean meal, and distillers dried grains with soluble fed to pigs[J]. Anim Biosci, 2023, 36(12): 1869-1879.

- [30] Edwinson AL, Yang L, Peters S, et al. Gut microbial β -glucuronidases regulate host luminal proteases and are depleted in irritable bowel syndrome[J]. Nat Microbiol, 2022, 7(5): 680-694.
- [31] Edogawa S, Edwinson AL, Peters SA, et al. Serine proteases as luminal mediators of intestinal barrier dysfunction and symptom severity in IBS[J]. Gut, 2020, 69(1): 62-73.
- [32] Hanning N, De Bruyn M, Ceuleers H, et al. Local colonic administration of a serine protease inhibitor improves post-inflammatory visceral hypersensitivity in rats[J]. Pharmaceutics, 2021, 13(6): 811.

(本文编辑: 翟若南)

本文引用格式:狄嘉欣, 肖嫩群, 彭买姣, 等. 丁酸钠促进四神丸调整肠道微生态治疗肾阳亏虚证泄泻的研究[J]. 中国感染控制杂志, 2025, 24(5): 638-646. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20257030.

Cite this article as: DI Jiaxin, XIAO Nenqun, PENG Maijiao, et al. Study on sodium butyrate enhancing the efficacy of Sishen pill in regulating intestinal microbiota for treating diarrhea with kidney-yang deficiency syndrome[J]. Chin J Infect Control, 2025, 24(5): 638-646. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20257030.