

· 论著 · 感染及脓毒症 ·

基于 16S 核糖体 RNA 高通量测序探讨 加味四君子汤对严重烫伤兔肠道 菌群多样性的影响



罗锦花 詹剑华 廖文强 程兴 黄凯

南昌大学第一附属医院烧伤与创面修复中心, 南昌 330006

通信作者: 詹剑华, Email: zjhseasky@163.com

【摘要】 目的 基于 16S 核糖体 RNA (16S rRNA) 高通量测序, 探讨加味四君子汤对严重烫伤兔肠道菌群多样性的影响。 **方法** 采用实验研究方法。选取 90 只 6~8 个月龄雌雄不限日本大耳兔, 按照随机数字表法分为正常对照组、单纯烫伤组、烫伤+低剂量组、烫伤+中剂量组、烫伤+高剂量组, 每组 18 只。正常对照组兔自由饮食、饮水, 单纯烫伤组、烫伤+低剂量组、烫伤+中剂量组、烫伤+高剂量组兔制作 30% 体表总面积 III 度烫伤模型后分别给予生理盐水、0.2 g/mL 加味四君子汤、1.0 g/mL 加味四君子汤、5.0 g/mL 加味四君子汤灌胃, 持续给药 7 d。于分组处理第 1、3、7 天, 采用酶联免疫吸附测定法检测各组兔回肠黏膜组织中的肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、IL-10 水平, 各组每个时间点的样本数为 6。根据前述实验结果, 另外选取 9 只兔分为正常对照组、单纯烫伤组、烫伤+中剂量组, 每组 3 只, 各组兔分组及处理方法同前。于分组处理第 7 天, 采用高通量测序技术对 3 组兔回肠黏膜菌群的 16S rRNA V3、V4 区进行测序; 采用 QIIME 软件统计菌群优质序列数目; 使用 RDP Classifier 软件分析菌群的门、纲、目、科、属水平; 采用 Illumina MiSeq 测序技术对菌群行 α 多样性 (Ace、Chao1、Simpson、Shannon 指数) 和 β 多样性分析。对数据行析因设计方差分析、SNK 检验及 Bonferroni 校正。 **结果** 与正常对照组相比, 单纯烫伤组、烫伤+低剂量组、烫伤+高剂量组分组处理第 1、3、7 天和烫伤+中剂量组分组处理第 1、3 天兔回肠黏膜组织中的 TNF- α 水平均明显升高 ($P < 0.01$), 单纯烫伤组、烫伤+低剂量组、烫伤+中剂量组、烫伤+高剂量组分组处理第 1、3、7 天兔回肠黏膜组织中的 IL-1 β 水平均明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 单纯烫伤组、烫伤+低剂量组、烫伤+中剂量组、烫伤+高剂量组分组处理第 1、3、7 天兔回肠黏膜组织中的 IL-10 水平均显著降低 ($P < 0.01$)。与单纯烫伤组相比, 烫伤+低剂量组、烫伤+中剂量组、烫伤+高剂量组分组处理第 3、7 天及烫伤+中剂量组分组处理第 1 天兔回肠黏膜组织中的 TNF- α 水平均明显降低 ($P < 0.01$), 烫伤+低剂量组、烫伤+中剂量组、烫伤+高剂量组分组处理第 3、7 天及烫伤+中剂量组分组处理第 1 天兔回肠黏膜组织中的 IL-1 β 水平均明显降低 ($P < 0.01$), 烫伤+低剂量组分组处理第 7 天和烫伤+中剂量组分组处理第 1、3、7 天以及烫伤+高剂量组分组处理第 3、7 天兔回肠黏膜组织中的 IL-10 水平均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与烫伤+低剂量组相比, 烫伤+中剂量组分组处理第 1、3、7 天和烫伤+高剂量组分组处理第 3、7 天兔回肠黏膜组织中的 TNF- α 水平均明显降低 ($P < 0.01$), 烫伤+中剂量组分组处理第 1、3、7 天和烫伤+高剂量组分组处理第 3、7 天兔回肠黏膜组织中的 IL-1 β 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 烫伤+中剂量组分组处理第 1、3、7 天和烫伤+高剂量组分组处理第 7 天兔回肠黏膜组织中的 IL-10 水平均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与烫伤+中剂量组相比, 烫伤+高剂量组分组处理第 1、3、7 天兔回肠黏膜组织中的

DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20200923-00421

本文引用格式: 罗锦花, 詹剑华, 廖文强, 等. 基于 16S 核糖体 RNA 高通量测序探讨加味四君子汤对严重烫伤兔肠道菌群多样性的影响 [J]. 中华烧伤与创面修复杂志, 2022, 38(3): 227-235. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20200923-00421.

Luo JH, Zhan JH, Liao WQ, et al. Investigating the effects of Modified Sijunzi Decoction on the diversity of intestinal microflora of severe scald rabbits based on 16S ribosomal RNA high-throughput sequencing [J]. Chin J Burns Wounds, 2022, 38(3): 227-235. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20200923-00421.



TNF- α 水平均明显升高 ($P < 0.01$), 烫伤+高剂量组分组处理第 1、3、7 天兔回肠黏膜组织中的 IL-10 水平均明显降低 ($P < 0.01$), 烫伤+高剂量组分组处理第 7 天兔回肠黏膜组织中的 IL-1 β 水平均显著降低 ($P < 0.01$)。与第 1 天比较, 单纯烫伤组分组处理第 3、7 天以及正常对照组分组处理第 3 天兔回肠黏膜组织中的 TNF- α 水平均明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 单纯烫伤组分组处理第 3、7 天兔回肠黏膜组织中的 IL-1 β 水平均明显升高 ($P < 0.01$), 烫伤+低剂量组、烫伤+高剂量组分组处理第 7 天和烫伤中剂量组分组处理第 3、7 天兔回肠黏膜组织中的 IL-10 水平均明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 烫伤+高剂量组分组处理第 3、7 天及烫伤+中剂量组分组处理第 7 天的兔回肠黏膜组织中的 TNF- α 水平均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 烫伤+中剂量组分组处理第 7 天兔回肠黏膜组织中的 IL-1 β 水平明显降低 ($P < 0.01$), 单纯烫伤组分组处理第 7 天兔回肠黏膜组织中的 IL-10 水平明显降低 ($P < 0.01$)。与第 3 天比较, 单纯烫伤组分组处理第 7 天兔回肠黏膜组织中的 TNF- α 、IL-1 β 水平及正常对照组、烫伤+低剂量组、烫伤+中剂量组和烫伤+高剂量组分组处理第 7 天兔回肠黏膜组织中的 IL-10 水平均明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 烫伤+低剂量组、烫伤+中剂量组、烫伤+高剂量组分组处理第 7 天兔回肠黏膜组织中的 TNF- α 水平均明显降低 ($P < 0.05$), 烫伤+中剂量组、烫伤+高剂量组分组处理第 7 天兔回肠黏膜组织中的 IL-1 β 水平均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 单纯烫伤组分组处理第 7 天兔回肠黏膜组织中的 IL-10 水平明显降低 ($P < 0.01$)。分组处理第 7 天, 正常对照组、单纯烫伤组、烫伤+中剂量组兔回肠黏膜中的菌群分别获 96 023、107 365、95 921 条优质序列。3 组兔回肠黏膜中的菌群在门、纲、目、科、属的分类水平上均分别以拟杆菌门和厚壁菌门、梭菌纲和拟杆菌纲、梭菌目和拟杆菌目、瘤胃菌科和梭菌科及拟杆菌科、梭菌属和拟杆菌属及瘤胃菌属菌群为主, 但各组菌群组成不同。3 组兔回肠黏膜中菌群的 Ace、Chao1、Simpson、Shannon 指数均没有显著差异 ($P > 0.05$), β 多样性无明显差异。 **结论** 严重烫伤后兔回肠黏膜炎症反应明显, 并呈时间依赖性增加。加味四君子汤可减轻炎症反应, 其治疗效果最佳质量浓度为 1.0 g/mL。高通量测序法能够精准地反映肠道菌群的结构组成, 加味四君子汤对严重烫伤后肠道菌群具有一定的调节作用。

【关键词】 植物制剂; 高通量核苷酸序列分析; 加味四君子汤; 严重烫伤; 肠道屏障; 肠道菌群; 16S 核糖体 RNA

基金项目: 江西省科技计划(20171BBG70061、2020BBG73020)

Investigating the effects of Modified Sijunzi Decoction on the diversity of intestinal microflora of severe scald rabbits based on 16S ribosomal RNA high-throughput sequencing

Luo Jinhua, Zhan Jianhua, Liao Wenqiang, Cheng Xing, Huang Kai

Burn and Wound Repair Center, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China

Corresponding author: Zhan Jianhua, Email: zjhseasky@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of Modified Sijunzi Decoction on the diversity of intestinal microflora of in severe scald rabbits based on 16S ribosomal RNA (16S rRNA) high-throughput sequencing. **Methods** The experimental research method was adopted. Ninety Japanese big-ear rabbits regardless gender, aged 6 to 8 months, were randomly divided into normal control group, scald alone group, scald+low-dose group, scald+medium-dose group, and scald+high-dose group, with 18 rabbits in each group. The rabbits in normal control group were free to eat and drink, and the rabbits in scald alone group, scald+low-dose group, scald+medium-dose group, and scald+high-dose group were intragastrically administered normal saline, 0.2 g/mL Modified Sijunzi Decoction, 1.0 g/mL Modified Sijunzi Decoction, and 5.0 g/mL Modified Sijunzi Decoction, respectively for 7 days after sustaining full-thickness scalding of 30% total body surface area. On the 1st, 3rd, and 7th day after grouping, the levels of tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin 1 β (IL-1 β), and IL-10 in ileal mucosa tissue of rabbits in each group were determined by enzyme-linked immunosorbent assay, and the number of samples in each group at each time point was 6. According to the above experimental results, another 9 rabbits were selected and divided into normal control group, scald alone group and scald+medium-dose group, with 3 rabbits in each group. The grouping and treatment methods of rabbits in each group were the same as before. On the 7th day after grouping, the V3, V4 region of 16S rRNA of ileum mucosa of rabbits in three groups were sequenced by high-throughput sequencing technology. The number of quality bacteria was counted by QIME software. The classifications of phylum, class, order, family and genus of microflora were analyzed by RDP Classifier software. The α diversity (Ace, Chao1, Simpson, and Shannon indexes) and β diversity were analyzed by Illumina MiSeq sequencing technology, and the number of experiment samples in each group was 3. Data were statistically

analyzed with analysis for variance of factorial design, SNK test, and Bonferroni correction. **Results** Compared with that in normal control group, the levels of TNF- α of ileal mucosa tissue of rabbits in scald alone group, scald+low-dose group, and scald+high-dose group on the 1st, 3rd, and 7th day after grouping and scald+medium-dose group on the 1st and 3rd day after grouping were all significantly increased ($P<0.01$), the levels of IL-1 β in ileal mucosa tissue of rabbits in scald alone group, scald+low-dose group, scald+medium-dose group and scald+high-dose group on the 1st, 3rd, and 7th day after grouping were all significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the levels of IL-10 in ileal mucosa tissue of rabbits in scald alone group, scald+low-dose group, scald+medium-dose group, and scald+high-dose group on the 1st, 3rd, and 7th day after grouping were all significantly decreased ($P<0.01$). Compared with that in scald alone group, the levels of TNF- α in ileal mucosa tissue of rabbits in scald+low-dose group, scald+medium-dose group, and scald+high-dose group on the 3rd and 7th day after grouping, and scald+medium-dose group on the 1st day after grouping were all significantly decreased ($P<0.01$), and the levels of IL-1 β in ileal mucosa tissue of rabbits in scald+low-dose group, scald+medium-dose group, and scald+high-dose group on the 3rd and 7th day after grouping and scald+medium-dose group on the 1st day after grouping were all significantly decreased ($P<0.01$), and the levels of IL-10 in ileal mucosa tissue of rabbits in scald+low-dose group on the 7th day after grouping and scald+medium-dose group on the 1st, 3rd, and 7th day after grouping and scald+high-dose group on the 3rd and 7th day after grouping were all significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with that in scald+low-dose group, the levels of TNF- α in ileal mucosa tissue of rabbits in medium-dose scald alone group on the 1st, 3rd, and 7th day after grouping and in high-dose scald alone group on the 3rd and 7th day after grouping were significantly decreased ($P<0.01$), and the levels of IL-1 β in ileal mucosa tissue of rabbits in medium-dose scald alone group on the 1st, 3rd, and 7th day after grouping and in high-dose scald alone group on the 3rd and 7th day after grouping were all significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the levels of IL-10 in ileal mucosa tissue of rabbits in scald+medium-dose group on the 1st, 3rd, and 7th day after grouping and in scald+high-dose group on the 7th day after grouping were all significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with that in scald medium-dose group, the levels of TNF- α in ileal mucosa tissue of rabbits in scald+high-dose group on the 1st, 3rd, and 7th day after grouping were all significantly increased ($P<0.01$), and the levels of IL-10 in ileal mucosa tissue of rabbits in scald+high-dose group on the 1st, 3rd, and 7th day after grouping were all significantly decreased ($P<0.01$), and the levels of IL-1 β in ileal mucosa tissue of rabbits in scald+high-dose group on the 7th day after grouping was significantly decreased ($P<0.01$). Compared with that on the 1st day after grouping, the levels of TNF- α in ileal mucosa tissue of rabbits in scald alone group on the 3rd and 7th day after grouping and in normal control group on the 3rd day after grouping were all significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the levels of IL-1 β in ileal mucosa tissue of rabbits in scald alone group both on the 3rd and 7th day after grouping were significantly increased ($P<0.01$), and the levels of IL-10 in ileal mucosa tissue of rabbits in both scald+low-dose group and scald+high-dose group on the 7th day after grouping and scald+medium-dose group both on the 3rd and 7th day after grouping were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the levels of TNF- α in ileal mucosa tissue of rabbits in scald+high-dose group on the 3rd and 7th day after grouping and in scald+medium-dose group on the 7th day after grouping were all significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the level of IL-1 β in ileal mucosa tissue of rabbits in scald+medium-dose group on the 7th day after grouping was significantly decreased ($P<0.01$), and the level of IL-10 in ileal mucosa tissue of rabbits in scald alone group on the 7th day after grouping was significantly decreased ($P<0.01$). Compared with that on the 3rd day after grouping, the levels of TNF- α and IL-1 β in ileal mucosa tissue of rabbits in scald alone group and the levels of IL-10 in ileal mucosa tissue of rabbits in normal control group, scald+low-dose group, scald+medium-dose group, and scald+high-dose group on the 7th day after grouping were all significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$); and the levels of TNF- α in ileal mucosa tissue of rabbits in scald+low-dose group, scald+medium-dose group, and scald+high-dose group on the 7th day after grouping were all significantly decreased ($P<0.05$), and the levels of IL-1 β in ileal mucosa tissue of rabbits both in scald+medium-dose group and scald+high-dose group on the 7th day after grouping were significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the levels of IL-10 in ileal mucosa tissue of rabbits in scald alone group on the 7th day after grouping was significantly decreased ($P<0.01$). On the 7th day after grouping, the high-quality sequences obtained from the microflora in ileum mucosa of rabbits in normal control group, scald alone group, and scald+medium-dose group were 96 023, 107 365, and 95 921, respectively. At the classification level of phylum, class, order, family, and genus of the microflora in ileum mucosa of rabbits in three groups were all *Bacteroidetes* and *Firmicutes*, *Clostridium* and *Bacteroidetes*, *Clostridium* and *Bacteroidetes*, *Rumenobacteriaceae* and *Clostridium* and *Bacteroidetes*, *Clostridium* and *Bacteroidetes* and *rumen bacteria* mainly, while the percentage of microflora in each group was different. There were no

significant differences in Ace, Chao1, Simpson, Shannon indices ($P>0.05$), and no obvious difference in β diversity of microflora in ileal mucosa tissue of rabbits among three groups. **Conclusions** After severe scalding, the inflammatory response of rabbit ileal mucosa tissue is obvious and increased in a time-dependent manner. Modified Sijunzi Decoction can reduce inflammation with optimal therapeutic concentration of 1.0 g/mL. The technology of high-throughput sequencing can reflect the structural composition of the intestinal microflora accurately. The ileal microflora of the severe scald rabbit can be regulated by the administration of Modified Sijunzi Decoction.

【Key words】 Plant preparations; High-throughput nucleotide sequencing; Modified Sijunzi Decoction; Severe scald; Intestinal barrier; Intestinal flora; 16S ribosomal ribonucleic acid

Fund program: Science and Technology Program of Jiangxi Province of China (20171BBG70061, 2020BBG73020)

肠道常驻菌群能够阻止外来菌群在肠道中定植或繁殖,是宿主抵御致病菌的主要菌群,在肠道免疫、营养吸收和黏膜屏障等功能中发挥非常重要的作用^[1]。严重烧伤后,患者肠黏膜通透性增加,肠道细菌移位、侵入肠系膜淋巴结组织,最终引起全身炎症反应以及肠源性感染^[2]。加味四君子汤可以明显改善肠黏膜微生物环境^[3]。宏基因组学以功能筛选和结果分析为研究手段,以微生物的功能活性、种群的结构以及多样性以及其与环境的关系作为研究方法,是对标本中全部微生物群体进行的基因组研究^[4]。16S核糖体DNA(16S rDNA)基因组存在于所有细菌中,且有种属特异性^[5],而利用高通量技术对16S rRNA基因扩增测序可获取庞大的数据信息,是目前研究菌群最常用的技术。采用该技术可检测患者患病前后肠道微生物菌群组成是否存在差异,并有针对性地分析其中与疾病相关的菌群,从而根据菌群分析结果预防和治疗相关疾病。本研究基于16S rRNA高通量测序技术,通过对严重烫伤兔进行加味四君子汤灌胃给药,观察其对肠道菌群的影响。

1 材料与方法

本实验研究遵循南昌大学第一附属医院实验动物伦理委员会和国家有关实验动物管理和使用的规定。

1.1 动物及主要试剂与仪器来源

99只6~8个月龄雌雄不限健康无特殊病原体级日本大耳兔(体重2.0~2.5 kg),购于南昌龙平兔业有限公司,许可证号:SCXK(赣)2014-0005。党参、白术、茯苓、炙甘草、黄芪、薏苡仁购于南昌大学第一附属医院中药房,蛋白裂解液购于北京百奥莱博科技有限公司,乳酸钠林格注射液购于湖南科伦制药有限公司,戊巴比妥注射液购于上海铭博生物科技有限公司,速眠新(含静松灵、乙二胺四乙酸、盐

酸二氢埃托啡等)购于吉林省教化市圣达动物药品有限公司,兔TNF- α 、IL-10、IL-1 β ELISA试剂盒购于武汉酶免生物科技有限公司,微生物DNA提取试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司,安捷伦高灵敏度DNA试剂盒购于美国Agilent公司,纳米DNA LT文库准备试剂盒购于美国Illumina公司,16S rRNA通用扩增引物序列购于美国Life公司。B16UV 911型高速冷冻离心机购于德国Beckman公司,FLx800型酶标仪、Ion S5TMXL型测序仪、Qubit4.0型核酸蛋白定量仪购于美国Thermo Fisher公司。

1.2 加味四君子汤制备

将党参300 g、白术300 g、茯苓350 g、炙甘草150 g、黄芪300 g、薏苡仁200 g放入药罐,加5 000 mL生理盐水浸泡30 min,再加5 000 mL生理盐水后大火煮沸+文火熬制60 min。冷却后过滤去渣得加味四君子汤原液320 mL,制成质量浓度为5.0 g/mL的药物工作液,4℃保存备用。

1.3 烫伤模型兔的制备

取兔称重,按照0.1 mL/kg的剂量于臀部肌肉注射速眠新+2 mL/kg的剂量于腹腔注射100 g/L水合氯醛进行麻醉(下同),电动剃须刀背部剃毛。禁食12 h,于次日将兔麻醉后将其剃毛部位浸入90~92℃的热水,持续20 s,造成30%TBSA的Ⅲ度烫伤(经病理切片证实)。烫伤创面涂碘伏抗感染,每天2次;同时,按照40 mL/kg的剂量腹腔注射乳酸钠林格注射液进行抗休克处理。

1.4 观察指标

本试验中,兔饲养于温度为22~25℃、明暗交替(12 h/12 h)的动物房中。

1.4.1 加味四君子汤对兔回肠黏膜炎症因子的影响 选取90只兔,按照随机数字表法(下同)分为正常对照组、单纯烫伤组、烫伤+低剂量组、烫伤+中剂量组、烫伤+高剂量组,每组18只。正常对照组兔不作任何处理且自由饮食、饮水;单纯烫伤组、烫

伤+低剂量组、烫伤+中剂量组、烫伤+高剂量组兔按照 1.3 制作烫伤模型后,分别给予等体积生理盐水、终质量浓度 0.2 g/mL 加味四君子汤(由 5.0 g/mL 加味四君子汤工作液加蒸馏水稀释制得)、终质量浓度 1.0 g/mL 加味四君子汤(稀释方法同前)、终质量浓度 5.0 g/mL 加味四君子汤灌胃,每天 3 次,每次 10 mL,持续 7 d。各组兔分别于分组处理的第 1、3、7 天,每组取 6 只兔,于耳静脉缘注入空气处死,取其回肠黏膜组织,生理盐水漂洗后,置于体积分数 4% 的中性甲醛中固定。按照 100 mg 组织加 1 mL 蛋白裂解液进行裂解,4 °C 条件下以离心半径 13 cm、10 000 r/min 离心 5 min。取上清液,按照 TNF- α 、IL-10、IL-1 β ELISA 试剂盒说明书,分别检测兔回肠黏膜组织中的 TNF- α 、IL-10、IL-1 β 水平。每个时间点的样本数均为 6。

1.4.2 加味四君子汤对兔回肠黏膜菌群的影响 另外选取 9 只兔分为正常对照组、单纯烫伤组、烫伤+中剂量组,每组 3 只,各组兔处理方法同 1.4.1。3 组兔分别于分组处理第 7 天处死,取回肠黏膜组织备用(方法均同上)。

1.4.2.1 回肠黏膜中菌群的基因测序 取兔回肠黏膜组织,根据微生物 DNA 提取试剂盒说明书提取兔回肠黏膜中菌群的总 DNA。PCR 扩增及产物纯化:16S rRNA V3、V4 区通用扩增引物序列的上游引物为 515F 5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3',下游引物为 907R 5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3',产物长度 175 bp^[6]。对上述扩增产物进行序列末端修复,切除 DNA 序列 5' 端的突出碱基,同时添加 1 个磷酸基团、补齐 3' 端的缺失碱基进行文库构建。采用核酸蛋白定量仪在 Promega QuantiFluor 荧光定量系统上对构建的文库进行定量分析。最后运用微生物生态学的定量测定软件 QIIME 1.8.0 剔除疑问序列后统计优质序列数目。样本数为 3。

1.4.2.2 回肠黏膜菌群结构分析 1.4.2.1 得到菌群的相关序列信息后,根据操作分类单元(OTU)97% 的相似性,将所有序列进行同源比对并聚类成 OTU。在 OTU 分析的基础上制作韦恩图,直观地反映回肠黏膜中菌群 OTU 数目组成相似性及重叠情况。使用 RDP Classifier 2.2 软件分析回肠黏膜菌群门、纲、目、科、属水平并统计各样品群落组成。样本数为 3。

1.4.2.3 回肠黏膜菌群组成分析 采用 Illumina MiSeq 测序技术对回肠黏膜菌群行 α 、 β 多样性分

析。 α 多样性反映单个样品内部的物种多样性,其中的 Ace、Chao1 指数用于计算菌群丰度,Simpson、Shannon 指数用于计算菌群多样性。采用主坐标分析法计算样品间的距离得到距离矩阵用于分析 β 多样性,反映不同样品在物种多样性方面存在的差异。样本数为 3。

1.5 统计学处理

使用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析。计量资料数据均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示;组间总体比较采用析因设计方差分析,组间两两比较采用 SNK 检验(软件自动略去该统计量值)及 Bonferroni 校正。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 加味四君子汤对回肠黏膜组织中的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 水平的影响

与正常对照组相比,单纯烫伤组、烫伤+低剂量组、烫伤+高剂量组分组处理第 1、3、7 天和烫伤+中剂量组分组处理第 1、3 天兔回肠黏膜组织中的 TNF- α 水平均明显升高($P < 0.01$),单纯烫伤组、烫伤+低剂量组、烫伤+中剂量组、烫伤+高剂量组分组处理第 1、3、7 天兔回肠黏膜组织中的 IL-1 β 水平均明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),单纯烫伤组、烫伤+低剂量组、烫伤+中剂量组、烫伤+高剂量组分组处理第 1、3、7 天兔回肠黏膜组织中的 IL-10 水平均显著降低($P < 0.01$)。与单纯烫伤组相比,烫伤+低剂量组、烫伤+中剂量组、烫伤+高剂量组分组处理第 3、7 天及烫伤+中剂量组分组处理第 1 天兔回肠黏膜组织中的 TNF- α 水平均明显降低($P < 0.01$),烫伤+低剂量组、烫伤+中剂量组、烫伤+高剂量组分组处理第 3、7 天及烫伤+中剂量组分组处理第 1 天兔回肠黏膜组织中的 IL-1 β 水平均明显降低($P < 0.01$),烫伤+低剂量组分组处理第 7 天和烫伤+中剂量组分组处理第 1、3、7 天以及烫伤+高剂量组分组处理第 3、7 天兔回肠黏膜组织中的 IL-10 水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与烫伤+低剂量组相比,烫伤+中剂量组分组处理第 1、3、7 天和烫伤+高剂量组分组处理第 3、7 天兔回肠黏膜组织中的 TNF- α 水平均明显降低($P < 0.01$),烫伤+中剂量组分组处理第 1、3、7 天和烫伤+高剂量组分组处理第 3、7 天兔回肠黏膜组织中的 IL-1 β 水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),烫伤+中剂量组分组处理第 1、3、7 天和烫伤+高剂量组分组处理第 7 天兔回肠黏膜组织中的

IL-10 水平均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与烫伤+中剂量组相比,烫伤+高剂量组分组处理第 1、3、7 天兔回肠黏膜组织中的 TNF- α 水平均明显升高 ($P < 0.01$),烫伤+高剂量组分组处理第 1、3、7 天兔回肠黏膜组织中的 IL-10 水平均明显降低 ($P < 0.01$),烫伤+高剂量组分组处理第 7 天兔回肠黏膜组织中的 IL-1 β 水平显著升高 ($P < 0.01$)。

与第 1 天比较,单纯烫伤组分组处理第 3、7 天以及正常对照组分组处理第 3 天兔回肠黏膜组织中的 TNF- α 水平均明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),单纯烫伤组分组处理第 3、7 天兔回肠黏膜组织中的 IL-1 β 水平均明显升高 ($P < 0.01$),烫伤+低剂量组、烫伤+高剂量组分组处理第 7 天和烫伤中剂量组分组处理第 3、7 天兔回肠黏膜组织中的 IL-10 水平均明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);烫伤+高剂量组分组处理第 3、7 天及烫伤+中剂量组分组处理第 7 天的兔回肠黏膜组织中的 TNF- α 水平均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),烫伤+中剂量组分组处理第 7 天兔回肠黏膜组织中的 IL-1 β 水平明显降低 ($P < 0.01$),单纯烫伤组分组处理第 7 天兔回肠黏膜组织中的 IL-10 水平明显降低 ($P < 0.01$)。与第 3 天比较,单纯烫伤组分组处理第 7 天兔回肠黏膜组织中的 TNF- α 、IL-1 β 水平及正常对照组、烫伤+低剂量组、烫伤+中剂量组和烫伤+高剂量组分组处理第 7 天兔回肠黏膜组织中的 IL-10 水平均明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);烫伤+低剂量组、烫伤+中剂量组、烫伤+高剂量组分组处理第 7 天兔回肠黏膜组织

中的 IL-1 β 水平均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),单纯烫伤组分组处理第 7 天兔回肠黏膜组织中的 IL-10 水平明显降低 ($P < 0.01$)。

以上结果,见表 1。

2.2 测序信息

分组处理第 7 天,3 组兔的回肠黏膜中共获得 299 309 条优质序列,其中正常对照组的 3 只兔回肠黏膜中菌群分别获 28 228、38 382、29 413 条,共 96 023 条优质序列;单纯烫伤组的 3 只兔回肠黏膜中菌群分别获 33 534、32 366、41 465 条,共 107 365 条优质序列;烫伤+中剂量组的 3 只兔回肠黏膜中菌群分别获 31 717、33 851、30 353 条,共 95 921 条优质序列。

2.3 菌群结构比较

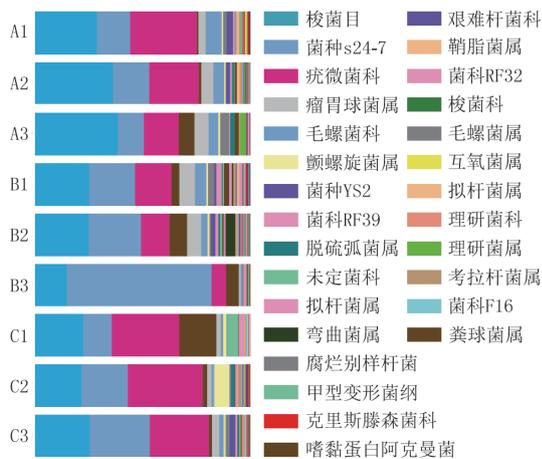
分组处理第 7 天,在门分类水平上,3 组兔回肠黏膜中的菌群均以拟杆菌门、厚壁菌门为主。在纲分类水平上,3 组兔回肠黏膜中的菌群均以梭菌纲和拟杆菌纲为主;正常对照组、单纯烫伤组、烫伤+中剂量组兔回肠黏膜中的梭菌纲、拟杆菌纲菌群分别占 72.4%、19.4%、44.7%、40.9%、63.3%、25.4%。在目分类水平上,3 组兔回肠黏膜中的菌群均以梭菌目和拟杆菌目为主;正常对照组、单纯烫伤组、烫伤+中剂量组兔回肠黏膜中的梭菌目、拟杆菌目菌群分别占 72.4%、19.4%、44.7%、40.9%、63.3%、25.4%。在科分类水平上,3 组兔回肠黏膜中的菌群均以瘤胃菌科、梭菌科和拟杆菌科为主;正常对照组兔回肠黏膜中的瘤胃菌科、梭菌科、拟杆菌科菌群分别占 39.7%、34.4%、14.7%;单纯烫伤组、烫伤+中剂量组兔回肠黏膜中的瘤胃菌科、梭

表 1 5 组兔分组处理第 1、3、7 天回肠黏膜组织的炎症水平 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	兔数 (只)	第 1 天			第 3 天			第 7 天		
		TNF- α	IL-1 β	IL-10	TNF- α	IL-1 β	IL-10	TNF- α	IL-1 β	IL-10
正常对照组	18	108.2 \pm 13.2	13.24 \pm 0.10	923 \pm 4	128.8 \pm 3.6 ^f	11.37 \pm 0.72	909 \pm 17	114.2 \pm 1.9 ^j	12.10 \pm 1.51	937 \pm 16 ^k
单纯烫伤组	18	254.1 \pm 26.3 ^a	33.41 \pm 1.96 ^a	638 \pm 28 ^a	321.5 \pm 15.8 ^{ag}	42.91 \pm 2.74 ^{ag}	602 \pm 80 ^a	344.7 \pm 10.5 ^{agk}	53.25 \pm 2.45 ^{agj}	447 \pm 30 ^{agj}
烫伤+低剂量组	18	256.0 \pm 28.7 ^a	31.55 \pm 2.93 ^a	660 \pm 27 ^a	260.4 \pm 10.7 ^{ab}	30.64 \pm 3.99 ^{ab}	658 \pm 13 ^a	242.6 \pm 11.8 ^{abk}	34.72 \pm 2.29 ^{ab}	696 \pm 26 ^{abgj}
烫伤+中剂量组	18	187.4 \pm 17.9 ^{abc}	26.26 \pm 2.08 ^{abc}	774 \pm 38 ^{abc}	174.3 \pm 19.9 ^{abc}	20.53 \pm 6.78 ^{abh}	816 \pm 27 ^{abci}	130.8 \pm 40.0 ^{abfk}	16.14 \pm 2.18 ^{abgk}	843 \pm 28 ^{abgk}
烫伤+高剂量组	18	240.7 \pm 18.0 ^{ad}	30.05 \pm 12.02 ^e	663 \pm 27 ^{ad}	209.8 \pm 11.6 ^{abcd}	26.51 \pm 1.61 ^{abh}	692 \pm 38 ^{adi}	201.0 \pm 12.4 ^{abcdgk}	23.76 \pm 0.53 ^{abgj}	749 \pm 33 ^{abdhk}
F 值		152.84	36.38	341.86	555.94	171.24	153.22	387.98	1325.73	833.79
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:烫伤+低剂量组、烫伤+中剂量组、烫伤+高剂量组兔烫伤后,分别给予等体积终质量浓度 0.2 g/mL、1.0 g/mL、5.0 g/mL 加味四君子汤灌胃;TNF 为肿瘤坏死因子,IL 为白细胞介素;各组各时间点的样本数均为 6;TNF- α 处理因素主效应, $F=716.67, P < 0.001$;时间因素主效应, $F=17.42, P < 0.001$;两者交互作用, $F=21.16, P < 0.001$;IL-1 β 处理因素主效应, $F=349.68, P < 0.001$;时间因素主效应, $F=8.19, P < 0.001$;两者交互作用, $F=15.97, P < 0.001$;IL-10 处理因素主效应, $F=819.03, P < 0.001$;时间因素主效应 $F=0.58, P=0.560$;两者交互作用, $F=21.82, P < 0.001$;与正常对照组相比, ^a $P < 0.01$ 、^a $P < 0.05$;与单纯烫伤组相比, ^b $P < 0.01$ 、ⁱ $P < 0.05$;与烫伤+低剂量组相比, ^c $P < 0.01$ 、^b $P < 0.05$;与烫伤+中剂量组相比, ^d $P < 0.01$;与组内第 1 天相比, ^f $P < 0.05$ 、^e $P < 0.01$;与组内第 3 天相比, ^j $P < 0.01$ 、^k $P < 0.05$

菌科、拟杆菌科菌群分别占17.8%、21.4%、37.6%，36.8%、33.1%、20.7%。在属的水平上，3组兔回肠黏膜中的菌群均以梭菌属、拟杆菌属和瘤胃菌属为主；正常对照组兔回肠黏膜中的梭菌属、拟杆菌属、瘤胃菌属菌群分别占34.4%、14.7%、23.6%，单纯烫伤组、烫伤+中剂量组兔回肠黏膜中的梭菌属、拟杆菌属、瘤胃菌属菌群分别占21.4%、37.6%、12.3%、25.4%、20.7%、31.3%。见图1。



注：烫伤+中剂量组兔烫伤后，给予终质量浓度1.0 g/mL加味四君子汤灌胃；A1、A2、A3为正常对照组3只兔样本，B1、B2、B3为单纯烫伤组3只兔样本，C1、C2、C3为烫伤+中剂量组3只兔样本

图1 3组兔分组处理第7天的回肠黏膜菌群在属分类水平的构成差异

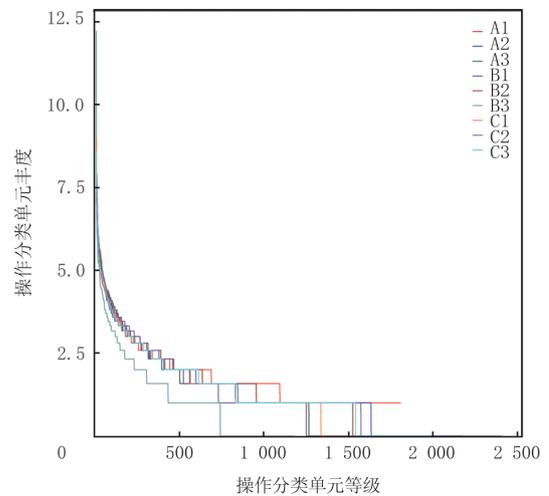
2.4 α多样性及分析β多样性分析

分组处理第7天，3组兔回肠黏膜中菌群丰度的曲线宽度及形状基本一致，曲线较宽，即菌群的物种均较丰富；曲线较为平坦，即3组样品的菌群组成比较均匀，见图2。3组兔回肠黏膜中菌群的Ace、Chao1、Simpson、Shannon指数均没有显著差异($P > 0.05$)，见表2。

主坐标分析显示，3组兔回肠黏膜中菌群分布距离相对集中，即β多样性无明显差异，见图3。

3 讨论

遭受严重烧创伤后，机体在抗生素、组织缺血缺氧、应激反应等因素作用下会出现肠道屏障功能受损，若患者伴有肠道菌群严重紊乱或肠道运动功能障碍，则其病死率更高^[7-8]。石冀^[9]认为肠道菌群与糖尿病、心血管、癌症等多种疾病的发生密切相关，肠道菌群可通过免疫、代谢产物等方面调节机体病理变化过程。



注：烫伤+中剂量组兔烫伤后，给予终质量浓度1.0 g/mL加味四君子汤灌胃；图中纵坐标为经过log₅处理的数据；A1、A2、A3为正常对照组3只兔样本，B1、B2、B3为单纯烫伤组3只兔样本，C1、C2、C3为烫伤+中剂量组3只兔样本

图2 3组兔分组处理第7天的回肠黏膜中菌群等级丰度曲线

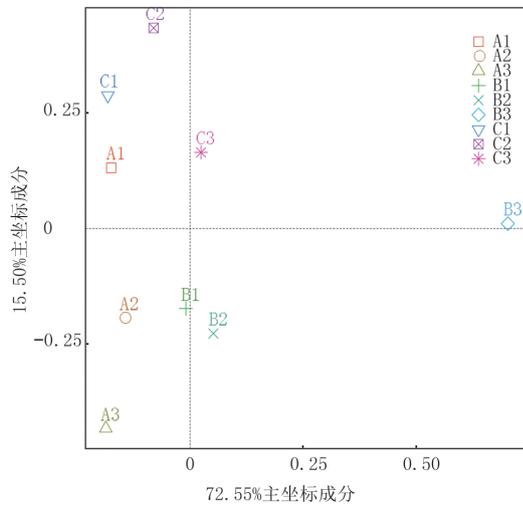
表2 3组兔分组处理第7天的回肠黏膜中菌群α多样性分析($\bar{x} \pm s$)

组别	兔数 (只)	Ace 指数	Chao1 指数	Simpson 指数	Shannon 指数
正常对照组	3	2 536 ± 661	2 396 ± 518	0.991 ± 0.011	9.78 ± 0.22
单纯烫伤组	3	2 205 ± 532	2 040 ± 519	0.923 ± 0.140	8.26 ± 2.38
烫伤+中剂量组	3	2 490 ± 169	2 303 ± 142	0.992 ± 0.012	9.69 ± 0.23
F值		0.78	1.10	1.48	2.27
P值		0.478	0.359	0.258	0.138

注：烫伤+中剂量组兔烫伤后，给予终质量浓度1.0 g/mL加味四君子汤灌胃

以往许多研究表明，四君子汤对小鼠肠道菌群平衡紊乱具有较好的预防与调节作用^[10-12]。邹孟龙等^[13]研究表明，四君子汤治疗溃疡性结肠炎的可能机制与四君子汤可下调靶蛋白、抑制肠上皮细胞凋亡有关。另外也有大量研究观察到加味四君子汤可通过增加肠道正常菌群数量来调节菌群失衡，促进肠黏膜功能损伤后的恢复及减少肠道细菌移位的发生，降低肠源性感染发生的概率，最终达到治疗目的^[14-16]。

正常情况下，肠道菌群处于稳定的平衡状态，但是一些外界因素和病理因素会破坏肠道微生态平衡，最终引起肠道菌群失调^[17-18]。本研究观察到，



注:烫伤+中剂量组兔烫伤后,给予终质量浓度 1.0 g/mL 加味四君子汤灌胃;A1、A2、A3 为正常对照组 3 只兔样本, B1、B2、B3 为单纯烫伤组 3 只兔样本, C1、C2、C3 为烫伤+中剂量组 3 只兔样本;主坐标成分表示菌群分布距离相对集中结果的解释度

图 3 3 组兔分组处理第 7 天的回肠黏膜菌群 β 多样性分析

与正常对照组相比,烫伤后第 1、3、7 天的 4 组兔回肠黏膜组织 TNF- α 和 IL-1 β 水平均升高,IL-10 水平均下降,这说明严重烫伤可激活肠道炎症反应,可能是严重烫伤早期肠道免疫屏障损害的机制之一。加味四君子汤治疗后,烫伤+低剂量组、烫伤+中剂量组、烫伤+高剂量组兔回肠黏膜组织 TNF- α 和 IL-1 β 水平均较单纯烫伤组呈基本下降趋势,IL-10 水平均较单纯烫伤组升高,这说明加味四君子汤可减轻严重烫伤后肠道炎症反应,可能与加味四君子汤对严重烫伤后机体免疫功能及肠道炎症反应的调控有关。与烫伤+低剂量组和烫伤+高剂量组相比,烫伤+中剂量组(1.0 g/mL)的兔回肠黏膜组织 TNF- α 和 IL-1 β 水平呈下降趋势、IL-10 呈升高趋势,并且这种效果会随着时间延长更加明显,这说明 1.0 g/mL 加味四君子汤用药浓度减轻严重烫伤后肠道炎症效果更佳且呈时间依赖性增加。

高通量测序具有速度快、成本低、准确性高等优势,相较于传统的样本细菌分离培养鉴定法,16S rRNA 基因测序可以从基因水平得到全部微生物菌落信息^[19]。16S rDNA 基因由 9 个高变区与 10 个保守区序列交错排列组成,高变区反映不同微生物之间的差异,保守区在所有细菌中基本保持不变,反映了生物物种间的亲缘关系。本研究利用 16S rRNA 基因的 V3、V4 高变区设计通用引物扩增出细菌的 16S rRNA 基因,通过测序得到 16S rRNA

基因片段序列后,再与 16S rDNA 数据库中的数据进行比较,从而将细菌鉴定到种、属水平^[20]。同时利用高通量测序技术分析各组肠道内容物菌群多样性,结果显示 3 组样本在菌群的种类上差异并不明显,在门的水平,3 组均以拟杆菌门、厚壁菌门为主。在纲分类水平,3 组样本均以梭菌纲和拟杆菌纲为主,只是 2 种菌纲在 3 组样本中的组成不同。在目分类水平,3 组样本均以梭菌目和拟杆菌目为主,但 2 种菌目在 3 组样本中所占的百分比不同。拟杆菌目分为降解草酸类和脲酶活性类,脲酶活性类产生脲酶,能够分解尿素,产生氨,增加血液循环中的氨含量。本研究中烫伤后的样本拟杆菌目数量大大增加,提示肠道菌群稳态被破坏。在科分类水平,3 组样本均以瘤胃菌科、梭菌科和拟杆菌科为主,但 3 种菌科在 3 组样本中的组成不同。梭菌科是产生丁酸盐的主要菌群,丁酸盐是肠道细胞的重要能量来源,能通过刺激紧密连接和黏液的产生影响胃肠道的屏障功能,本研究中烫伤后样本的梭菌科下降可能是肠道屏障损伤的机制之一。瘤胃菌属能促进消化代谢,梭菌属可以产生维生素和抑制有害菌生长。在属水平,3 组样本以梭菌属、拟杆菌属和瘤胃菌属为主,但 3 种菌属在 3 组样本中的组成不同,烫伤后(单纯烫伤组、烫伤+中剂量组)兔回肠中的拟杆菌属比例上升,梭菌属和瘤胃菌属比例呈基本下降趋势,这说明严重烫伤造成了肠道菌群的变化而加味四君子汤可调节这种菌群组成。

本研究通过 α 多样性分析结果显示,3 组样本丰度曲线都比较一致,说明 3 组样品的菌群组成比较均匀,各组菌群丰度无太大差异。并且 3 组样本的 Ace、Chao1、Simpson、Shannon 指数没有显著差异。 β 多样性分析显示,3 组样本分布距离相对集中,即 β 多样性无明显差异,说明烫伤对肠道内菌群数量和菌类多样性影响甚微,而主要对肠道菌群结构组成造成影响。

综上所述,严重烫伤后兔回肠黏膜炎症反应重,且时间越长损伤越明显。加味四君子汤能促进严重烫伤兔回肠黏膜组织修复,减轻炎症反应。其治疗效果最佳质量浓度为 1.0 g/mL。各组样本中菌群菌种无明显差异,但不同菌种中细菌的百分比不同,提示严重烫伤后肠道菌群出现了紊乱,加味四君子汤对肠道微生物平衡起到重要的调节作用。高通量测序法与传统的菌群分析法相比,能更精确地反映肠道菌群的结构组成,为临床疾病早期预警

及防治提供新方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 罗锦花: 直接参与酝酿和设计实验、实施研究、分析数据、起草文章; 詹剑华: 酝酿和设计实验, 行政、技术或材料支持, 指导实验; 廖文强: 参与文章的数据采集、分析、解释及文章的撰写; 程兴: 参与文章的数据分析及解释; 黄凯: 支持性贡献

参考文献

- [1] Flowers SA, Ward KM, Clark CT. The gut microbiome in bipolar disorder and pharmacotherapy management[J]. *Neuropsychobiology*, 2020, 79(1): 43-49. DOI: 10.1159/000504496.
- [2] He W, Wang Y, Wang P, et al. Intestinal barrier dysfunction in severe burn injury[J/OL]. *Burns Trauma*, 2019, 7: 24[2022-03-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31372365/>. DOI: 10.1186/s41038-019-0162-3.
- [3] 王春南. 四君子汤对肝强脾弱型脑瘫患儿肠道微生态调节作用的临床观察及机制研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2017, 44(3): 537-540. DOI: 10.13192/j.issn.1000-1719.2017.03.031.
- [4] Li W, Dong S, Xu J, et al. Viral metagenomics reveals sapoviruses of different genogroups in stool samples from children with acute gastroenteritis in Jiangsu, China[J]. *Arch Virol*, 2020, 165(4): 955-958. DOI: 10.1007/s00705-020-04549-y.
- [5] 郭美薇, 刘凡铭, 邹伟. 16SrRNA 测序技术在肠道菌群检测中的研究进展[J]. *实验室科学*, 2019, 22(2): 1-4, 8. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4305.2019.02.001.
- [6] Liu H, Chen X, Hu X, et al. Alterations in the gut microbiome and metabolism with coronary artery disease severity[J]. *Microbiome*, 2019, 7(1): 68. DOI: 10.1186/s40168-019-0683-9.
- [7] Volynets V, Louis S, Pretz D, et al. Intestinal barrier function and the gut microbiome are differentially affected in mice fed a western-style diet or drinking water supplemented with fructose[J]. *J Nutr*, 2017, 147(5): 770-780. DOI: 10.3945/jn.116.242859.
- [8] Gigli S, Seguela L, Pesce M, et al. Cannabidiol restores intestinal barrier dysfunction and inhibits the apoptotic process induced by *Clostridium difficile* toxin A in Caco-2 cells[J]. *United European Gastroenterol J*, 2017, 5(8): 1108-1115. DOI: 10.1177/2050640617698622.
- [9] 石冀. 肠道菌群与疾病关系的研究进展[J]. *重庆医学*, 2019, 48(22): 3888-3891, 3896. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8348.2019.22.026.
- [10] 马祥雪, 王风云, 符俊杰, 等. 基于肠道菌群的中医健脾方剂作用机制的研究现状与思考[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(5): 210-215. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.2017050210.
- [11] 郑国钰, 詹剑华, 罗锦花, 等. 加味四君子汤对严重烫伤大鼠肠组织细胞因子的影响[J]. *南昌大学学报(医学版)*, 2018, 58(3): 11-15, 30. DOI: 10.13764/j.cnki.ncdm.2018.03.003.
- [12] 唐华羽, 李玉芝, 李长德, 等. 四君子汤总多糖对小鼠肠道菌群及免疫功能的影响[J]. *陕西中医*, 2016, 37(12): 1688-1691. DOI: 10.3969/j.issn.1000-7369.2016.12.054.
- [13] 邹孟龙, 黄晓燕, 陈雅璐, 等. 基于网络药理学探讨四君子汤治疗溃疡性结肠炎的作用机制及实验验证[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(22): 5362-5372. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20200810.405.
- [14] 卢永康, 陈奕圆, 庄贤勉, 等. 四君子汤调节大鼠肠道菌群改善心肌肥厚诱导心力衰竭的研究[J]. *现代中药研究与实践*, 2020, 34(5): 29-33. DOI: 10.13728/j.1673-6427.2020.05.006.
- [15] 曹静, 查安生. 四君子汤对溃疡性结肠炎大鼠肠道菌群调节作用研究[J]. *中医药临床杂志*, 2019, 31(1): 102-104. DOI: 10.16448/j.cjcm.2019.0030.
- [16] 王雨珊, 李万丛, 游颖, 等. 中药调节肠道菌群改善人体健康的研究进展[J]. *中草药*, 2018, 49(9): 2203-2209. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.09.033.
- [17] Feng Y, Huang Y, Wang Y, et al. Severe burn injury alters intestinal microbiota composition and impairs intestinal barrier in mice[J/OL]. *Burns Trauma*, 2019, 7: 20[2022-03-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31312663/>. DOI: 10.1186/s41038-019-0156-1.
- [18] Song Y, Li Y, Xiao Y, et al. Neutralization of interleukin-17A alleviates burn-induced intestinal barrier disruption via reducing pro-inflammatory cytokines in a mouse model[J/OL]. *Burns Trauma*, 2019, 7: 37[2022-03-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31890716/>. DOI: 10.1186/s41038-019-0177-9.
- [19] 张俊杰, 张淑静, 董瑞娟, 等. 高通量测序研究中药经方对正常小鼠肠道菌群的影响[J]. *世界中医药*, 2019, 14(5): 1123-1132, 1138. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7202.2019.05.014.
- [20] MacDonald NJ, Parks DH, Beiko RG. Rapid identification of high-confidence taxonomic assignments for metagenomic data[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(14): e111. DOI: 10.1093/nar/gks335.

(收稿日期: 2020-09-23)

· 科技快讯 ·

烧伤后严重免疫状态改变与细菌感染和脓毒性休克相关

引用格式: Moins-Teisserenc H, Cordeiro DJ, Audigier V, et al. Severe altered immune status after burn injury is associated with bacterial infection and septic shock[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 586195. DOI: 10.3389/fimmu.2021.586195.

患者烧伤后, 具有较高的死亡风险。烧伤后机体的免疫和炎症反应模式是否与患者预后相关, 尚不清楚。该研究的目的是探讨重症烧伤患者的全身免疫和炎症反应与预后之间的关系。选取重度烧伤患者为研究对象, 在入院即刻及第 2、7、14 和 28 天收集血液标本, 通过流式细胞术进行细胞计数和细胞因子分析。结果显示, 烧伤患者入院时外周血中恒定自然杀伤 T 细胞(iNKT)、 $\gamma\delta$ T 细胞和黏膜相关恒定 T 细胞的数量明显下降, 这些细胞发挥着对抗抗原应激和维持内环境稳态的重要作用。同时, 单核细胞表达人类白细胞抗原 DR(HLA-DR)、自然杀伤(NK)细胞表达 NKG2D 受体和中性粒细胞表达 CD16 的水平均显著降低。入院时, 外周血中 CD8 T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、B 细胞和 iNKT 计数较低的患者更易发生细菌感染, 而 HLA-DR/单核细胞的延迟恢复和晚期细胞因子分泌失调则与脓毒症休克的发生有关。患者早期(第 1 周)的免疫反应模式与 90 d 内病死率没有显著相关性; 然而延迟、持续的细胞因子谱改变和后期低 HLA-DR/单核细胞水平在死亡患者中更加明显。

刘双庆, 编译自《*Front Immunol*》, 2021, 12: 586195; 姚咏明, 审校