

基于 16S rDNA 测序分析益气活血解毒方 对老年肺源性脓毒症患者肠道菌群的影响： 一项多中心前瞻性随机双盲对照试验

陈瑞^{1,2} 赖嘉华¹ 钟敏林¹ 曾瑞峰^{1,2} 赖芳³ 禹移⁴ 刘云涛^{1,2} 奚小土^{1,2} 李俊^{5,6}

¹ 广州中医药大学第二附属医院(广东省中医院)急诊科, 广州 510120; ² 广东省中医急症研究重点实验室, 广州 510120; ³ 广州中医药大学第二附属医院(广东省中医院)芳村医院 ICU, 广东广州 510370; ⁴ 广州中医药大学第二附属医院(广东省中医院)大学城医院 ICU, 广东广州 510006; ⁵ 广州中医药大学第一附属医院医院办公室, 广东广州 510405; ⁶ 中医药广东省实验室, 广东珠海 519000

通信作者: 李俊, Email: lijun@gzucm.edu.cn

【摘要】目的 探讨联合益气活血解毒方治疗对老年肺源性脓毒症患者肠道菌群的影响及其潜在的微生物靶点。**方法** 采用前瞻性随机双盲对照试验, 纳入 2020 年 11 月至 2021 年 10 月于广东省中医院总院区急诊科、广东省中医院芳村医院重症监护病房(ICU)、广东省中医院大学城医院 ICU 住院的老年肺部感染继发脓毒症患者, 并随机分为两组, 两组患者均给予常规西医治疗, 在此基础上, 观察组联合益气活血解毒方(含人参 15 g, 三七 9 g, 大黄 3 g, 加 50 mL 温开水溶化)口服/鼻饲, 每日 2 次, 持续 7 d; 对照组给予安慰剂。于治疗前和治疗第 5~7 天收集相关临床资料及新鲜粪便样本, 通过 16S rDNA 测序和生物信息学分析[α 多样性、 β 多样性、线性判别分析效应量分析(LEfSe)]评估肠道菌群多样性、菌群结构等。**结果** 共纳入 55 例患者, 对照组 29 例, 观察组 26 例。两组患者性别、年龄、基础疾病及基线序贯器官衰竭评分(SOFA)、急性生理学及慢性健康状况评分 II (APACHE II)、急性胃肠损伤(AGI)分级评分、胃肠功能衰竭评分(GIF)等差异均无统计学意义。与对照组比较, 观察组治疗第 7 天血清降钙素原、APACHE II 评分更低, GIF 评分下降更为显著。治疗前留取到 30 个粪便样本(基线组), 治疗后对照组留取到 29 个样本, 观察组留取到 26 个样本。肠道菌群 α 多样性分析表明, 观察组和对对照组 Simpson 指数较基线组明显下降[0.75(0.53, 0.91)、0.81(0.32, 0.91)比 0.88(0.87, 0.89), 均 $P < 0.05$], 但观察组与对照组间差异无统计学意义; 3 组间 Chao1、Ace 指数、Shannon 指数差异均无统计学意义。 β 多样性分析显示, 3 组间肠道菌群结构存在一定差异($R^2 = 0.096$, $P = 0.026$)。物种差异分析显示, 3 组肠道菌群在门水平上差异无统计学意义, 整体丰度较高的 4 种菌门分别为厚壁菌门(53.69%)、放线菌门(16.23%)、变形菌门(15.39%)、拟杆菌门(9.57%)。而在属水平上, 3 组间共有 38 种菌属差异存在统计学意义, 其中, 与对照相比, 观察组可显著提高欧陆森菌属($P = 0.014$)、福涅拉菌属($P = 0.013$)的丰度, 降低拟杆菌属($P = 0.009$)、嗜胆菌属($P = 0.005$)、*Eggerthella* 菌属($P = 0.002$)、柯林斯菌属($P = 0.043$)的丰度。LefSe 分析结果显示, 唾液乳杆菌属、欧陆森菌属、柯林斯菌属、*Cloacibacillus* 菌属、拟杆菌属在不同组间差异显著。**结论** 常规西医治疗联合益气活血解毒方可改变老年肺源性脓毒症患者的肠道菌群结构, 其中拟杆菌属、欧陆森菌属、柯林斯菌属可能是其治疗脓毒症的关键微生物靶点。

【关键词】 老年肺源性脓毒症; 肠道菌群; 16S rDNA 测序; 益气活血解毒方; 中药

基金项目: 国家自然科学基金(82204936, 82474409); 广东省广州市基础与应用基础研究项目(2023A04J0476)

临床试验注册: 中国临床试验注册中心, ChiCTR 2000037831

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20240820-00709

Effects of Yiqi Huoxue Jiedu formula on the gut microbiota in elderly patients with pulmonary-derived sepsis based on 16S rDNA sequencing: a multicenter prospective randomized double-blind controlled trial

Chen Rui^{1,2}, Lai Jiahua¹, Zhong Minlin¹, Zeng Ruifeng^{1,2}, Lai Fang³, Yu Yi⁴, Liu Yuntao^{1,2}, Xi Xiaotu^{1,2}, Li Jun^{5,6}

¹Department of Emergency, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine (Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine), Guangzhou 510120, Guangdong, China; ²Guangdong Provincial Key Laboratory of Research on Emergency in TCM, Guangzhou 510120, Guangdong, China; ³Department of ICU, Fangcun Hospital, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine (Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine), Guangzhou 510370, Guangdong, China; ⁴Department of ICU, Daxuecheng Hospital, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine (Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine), Guangzhou 510006, Guangdong, China; ⁵Department of Hospital Office, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong, China; ⁶Chinese

Medicine Guangdong Laboratory, Zhuhai 519000, Guangdong, China

Corresponding author: Li Jun, Email: lijun@gzucm.edu.cn

[Abstract] Objective To investigate the effects of the combined Yiqi Huoxue Jiedu formula (YHJF) on intestinal microbiota in elderly patients with pulmonary-derived sepsis and identify potential microbial targets. **Methods** A prospective randomized double-blind controlled trial was conducted. Elderly patients with pulmonary infection-induced sepsis admitted to the emergency department of Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine (TCM), intensive care unit (ICU) of Fangcun Hospital, and ICU of Daxuecheng Hospital, from November 2020 to October 2021 were enrolled and randomized into two groups. Both groups received conventional Western medicine treatment. The observation group additionally received YHJF (composed of 15 g of Panax ginseng, 9 g of Panax notoginseng, and 3 g of Rheum palmatum, dissolved in 50 mL warm water) orally or via nasogastric tube twice daily for 7 days; while the control group received a placebo. Clinical data and fresh fecal samples were collected before treatment and on days 5–7 of treatment. Intestinal microbiota diversity and structure were analyzed via 16S rDNA sequencing and bioinformatics [α diversity, β diversity, and linear discriminant analysis effect size (LEfSe)]. **Results** Fifty-five patients were included (29 in the control group, 26 in the observation group). There were no significant differences in gender, age, comorbidities, and baseline sequential organ failure assessment (SOFA), acute physiology and chronic health evaluation II (APACHE II), acute gastrointestinal injury (AGI) classification score, and gastrointestinal failure (GIF) score between the two groups. Compared to the control group, the observation group showed significantly lower serum procalcitonin, APACHE II score, and greater reduction in GIF score by day 7. Thirty fecal samples were collected pre-treatment (baseline group), 29 post-treatment from the control group, and 26 from the observation group. Gut microbiota α diversity analysis revealed that Simpson index in the observation group and control group were significantly decreased compared to the baseline group [0.75 (0.53, 0.91), 0.81 (0.32, 0.91) vs. 0.88 (0.87, 0.89), both $P < 0.05$], but there was no significant difference between the observation group and the control group. There were no significant differences in Chao1, Ace, and Shannon indices among three groups. β diversity analysis indicated that distinct microbiota structures among three groups ($R^2 = 0.096$, $P = 0.026$). Species difference analysis showed that, at the phylum level, *Firmicutes* (53.69%), *Actinobacteria* (16.23%), *Proteobacteria* (15.39%), and *Bacteroidetes* (9.57%) dominated, with no significant intergroup differences. At the genus level, 38 taxa showed significant differences. Compared to the control group, the observation group exhibited increased *Erysipelatoclostridium* ($P = 0.014$) and *Faecalibacterium* ($P = 0.013$), and decreased *Bacteroides* ($P = 0.009$), *Bilophila* ($P = 0.005$), *Eggerthella* ($P = 0.002$), and *Collinsella* ($P = 0.043$). LEfSe analysis highlighted *Lactobacillus salivarius*, *Erysipelatoclostridium*, *Collinsella*, *Cloacibacillus*, and *Bacteroides* as key discriminators. **Conclusion** YHJF combined with conventional therapy alters intestinal microbiota structure in patients with elderly pulmonary-derived sepsis, with *Bacteroides*, *Erysipelatoclostridium*, and *Collinsella* identified as potential microbial targets.

[Key words] Elderly pulmonary-derived sepsis; Gut microbiota; 16S rDNA sequencing; Yiqi Huoxue Jiedu formula; Chinese medicine

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82204936, 82474409); Basic and Applied Basic Research Projects of Guangzhou city of Guangdong Province (2023A04J0476)

Trial Registration: Chinese Clinical Trial Registry, ChiCTR 2000037831

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20240820-00709

脓毒症被定义为机体对感染的反应失调导致的危及生命的器官功能障碍,是住院患者常见的死亡原因。据估计,全球每年死于脓毒症的患者占总死亡人数的近 20%^[1]。2017 至 2019 年,我国每年有 480 万至 610 万的脓毒症住院患者,其中 65 岁以上者占 56.5%^[2]。肺部感染是老年脓毒症患者较常见的原发因素,且其病情往往更重,病死率更高^[3-4]。肠道微生物群是一个复杂的微生物群落,健康的肠道菌群与机体免疫屏障密切相关^[5]。脓毒症对肠道微环境的破坏性作用使微生物组成发生剧烈变化,同时由于机械免疫屏障的破坏继发肠道菌群移位,菌群或内毒素向血液或远处器官播散导致病情进一步加重^[6-7]。中医药因其对脓毒症胃肠损伤显著的治疗效果和较少的不良反应在临床上得到广泛认可^[8-9],其疗效机制除减轻黏膜机械损伤外,还可

能与肠道菌群的调节密切相关^[10]。本课题组在国医大师陈绍宏教授指导下,基于老年脓毒症患者“虚”“毒”“瘀”的核心病机拟定了益气活血解毒方(益气活血散)^[11],该方可从减轻胃肠损伤、调整免疫稳态、改善微循环等多方面改善脓毒症患者的器官功能,但其具体作用机制尚不明确。本研究通过 16S rDNA 测序结合生物信息学分析,旨在观察联合益气活血解毒方治疗对老年肺源性脓毒症患者肠道菌群的影响,并探究其治疗效果背后的微生物机制,为脓毒症的中西医联合干预提供证据支撑。

1 资料与方法

1.1 研究对象: 筛查 2020 年 11 月至 2021 年 10 月于广东省中医院总院区急诊科、广东省中医院芳村医院重症监护病房(intensive care unit, ICU)、广东省中医院大学城医院 ICU 住院的老年肺部感染继

发脓毒症患者。

1.1.1 纳入标准:符合脓毒症诊断标准^[12-13];符合肺部感染诊断标准^[14-15],且脓毒症感染源考虑为肺部感染;入院时发病时间 ≤ 5 d;年龄 65~85 岁;签署知情同意书者。

1.1.2 排除标准:24 h 内可能死亡者;病情严重需要心肺复苏者;恶性肿瘤晚期存在恶液质者;有急性冠状动脉疾病者,如急性心肌梗死等;对益气活血解毒方处方中药过敏,或过敏体质者;妊娠期妇女;合并自身免疫性疾病;1 个月内有抗菌药物、免疫毒性药物、益生菌服用史者。

1.1.3 剔除标准:未服用足疗程益气活血解毒方,无法评价疗效者;治疗第 5~7 天未留取到粪便标本者。

1.2 伦理学:本研究符合医学伦理学标准,经广东省中医院伦理委员会审查批准(审批号:BF2020-153-01),所有患者均签署知情同意书。

1.3 分组与干预

1.3.1 随机双盲对照方案的实施:采用随机双盲设计,将患者按 1:1 的比例分为观察组(益气活血解毒方)和对照组(安慰剂)。通过计算机生成随机编码表,直接分配患者至对应组别,两组药物经统一加工后,外观、气味、颗粒性状及包装完全一致,确保受试者、研究者和数据统计人员无法通过感官或标签识别组别。随机编码表全程密封保存,仅在研究结束后统一揭盲时启用。研究期间所有药物发放、临床操作及数据记录均严格遵循盲法原则,避免主观偏倚。研究完成后,进行揭盲明确观察组与对照组的实际干预措施,并基于盲态数据进行统计分析,确保结果的客观性和科学性。

1.3.2 干预:观察组在脓毒症指南西医干预方案基础上^[12],给予益气活血解毒方颗粒剂(含人参 15 g、三七 9 g、大黄 3 g,用 50 mL 温开水溶化)口服/鼻饲,每次 1 袋,每日 2 次,疗程 7 d。对照组在西医干预方案基础上,加用安慰剂颗粒剂。

1.4 观察指标及方法

1.4.1 一般指标:患者入组后每日随访,于入组当日治疗前(D0)、治疗第 7 天(D7)取空腹静脉血,常规检测白细胞计数(white blood cell count, WBC)、降钙素原(procalcitonin, PCT)、C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、血乳酸(lactic acid, Lac)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)水平,并进行序贯器官衰竭评分(sequential

organ failure assessment, SOFA)、急性生理学与慢性健康状况评分 II (acute physiology and chronic health evaluation II, APACHE II)、急性胃肠损伤(acute gastrointestinal injury, AGI)分级评分、胃肠功能衰竭评分(gastrointestinal failure, GIF)。AGI 分级进行评分赋值, I 级记为 1 分, II 级记为 2 分, III 级记为 3 分, IV 级记为 4 分。随访 28 d,记录患者 28 d 生存情况。

1.4.2 肠道菌群检测:于 D0 及治疗第 5~7 天(D5~D7)清晨留取新鲜粪便备检。

1.4.2.1 样本 DNA 提取与 16S rDNA 测序:采集粪便样本后,提取总 DNA 并检测其纯度与浓度。以 DNA 为模板,用细菌 16S rRNA 基因 V3~V4 区通用引物进行聚合酶链反应扩增,正向引物:5'-ACTCC TACGGGAGGCAGCAG-3',反向引物:5'-GGACTACH VGGGTWTCTAAT-3'。扩增程序:94℃预变性 3 min;94℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s,进行 18 个循环;最后 72℃延伸 5 min。通过 2% 琼脂糖凝胶电泳验证扩增产物质量,用磁珠纯化试剂盒(Agencourt AMPure XP)纯化目标片段。将等摩尔量的纯化产物混合成文库,通过荧光定量系统(Qubit)测定文库浓度,并在 Illumina NovaSeq 测序平台上完成双端测序。

1.4.2.2 生物信息学分析:使用 QIIME 1.9.0 软件对原始测序数据进行质量过滤及生物信息学分析,以解析肠道菌群组成和多样性。先进行低质量过滤、长度过滤,得到高质量序列;将高质量序列进行聚类/去噪,划分操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU),并根据 OTU 的序列通过与 Greengene 数据库比对得到物种分类,并在门、纲、目、科、属、种分类学水平上进行分类学分析获得群落结构图。通过 α 多样性分析研究单个样品内部的物种多样性,基于 OTU 计算各组样品的 Chao1、Ace、Shannon 及 Simpson 指数,绘制样品稀释曲线;通过 β 多样性分析比较不同样品在物种多样性方面(群落组成及结构)的差异,基于主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA 分析)可视化组间菌群结构差异。用线性判别分析效应量分析(linear discriminant analysis effect size, LEfSe)衡量组间物种丰度组成差异,筛选差异菌群。

1.5 统计学分析:用 SPSS 23.0 软件分析数据。以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示符合正态分布的计量资料,采用 t 检验;以中位数(四分位数)[$M(Q_L, Q_U)$]

表示非正态分布的计量资料,采用秩和检验。用 χ^2 检验分析分类变量的组间差异。双侧检验,检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象基线特征(表 1):共纳入 60 例老年脓毒症患者,因未留取到粪便标本、转院等原因脱落 5 例,最后纳入分析 55 例,男性 48 例,女性 7 例;平均年龄 (73.09 ± 6.67) 岁。其中对照组 29 例,观察组 26 例,两组性别、年龄、基础疾病、基线 SOFA 评分、APACHE II 评分、AGI 分级评分和 GIF 评分等比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

表 1 不同治疗方法两组老年肺源性脓毒症患者基线特征比较				
指标	对照组 (n=29)	观察组 (n=26)	t / χ^2 / H 值	P 值
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	71.48 $\pm$ 4.74	71.46 $\pm$ 6.47	3.743	0.990
男性[例(%)]	26(89.7)	22(84.6)	0.313	0.437
基础疾病[例(%)]				
高血压	20(69.0)	18(69.2)	0.000	0.607
糖尿病	11(37.9)	10(38.5)	0.002	0.593
消化系统疾病	2(6.9)	1(3.8)	0.247	0.542
恶性肿瘤	3(10.3)	4(15.4)	0.313	0.437
入住 ICU [例(%)]	23(79.3)	21(80.8)	0.018	0.581
机械通气[例(%)]	22(75.9)	21(80.8)	0.194	0.457
SOFA 评分 [分, $M(Q_L, Q_U)$]	5.0(3.0, 7.0)	6.0(4.0, 7.5)	0.049	0.956
APACHE II 评分(分, $\bar{x} \pm s$)	17.17 $\pm$ 9.69	17.23 $\pm$ 8.20	0.126	0.326
AGI 分级评分 [分, $M(Q_L, Q_U)$]	2(2, 3)	2(2, 3)	0.488	0.669
GIF 评分[分, $M(Q_L, Q_U)$]	2.0(2.0, 3.0)	2.0(2.0, 3.0)	0.734	0.567
Lac (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	1.70 $\pm$ 0.58	1.60 $\pm$ 0.55	0.080	0.820
TBIL (μ mol/L, $\bar{x} \pm s$)	20.20 $\pm$ 3.46	18.00 $\pm$ 4.19	0.127	0.723

注:对照组为给予安慰剂,观察组为给予益气活血解毒方;ICU 为重症监护病房,SOFA 为序贯器官衰竭评分,APACHE II 为急性生理学及慢性健康状况评分 II,AGI 为急性胃肠损伤,GIF 为胃肠功能衰竭评分,Lac 为血乳酸,TBIL 为总胆红素

2.2 主要疗效比较(表 2)

2.2.1 炎症指标:观察组 D7 血清 PCT 较对照组更低($P < 0.05$),WBC、CRP、IL-6 虽有降低趋势,但差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

2.2.2 胃肠功能:与对照组相比,观察组患者治疗后 GIF 评分下降幅度更为显著($P < 0.05$),AGI 分级略有改善趋势($P > 0.05$)。

2.2.3 预后与重症评分:两组 28 d 病死率差异无统计学意义($P > 0.05$)。观察组患者 D7 的 APACHE II 评分较对照组明显降低($P < 0.05$),SOFA 评分略有降低趋势($P > 0.05$)。观察组患者住院时间较对照组有缩短趋势($P > 0.05$)。

表 2 不同治疗方法两组老年肺源性脓毒症患者主要疗效指标比较				
指标	对照组 (n=29)	观察组 (n=26)	t / H / χ^2 值	P 值
WBC (D7, $\times 10^9/L, \bar{x} \pm s$)	12.55 $\pm$ 7.63	11.97 $\pm$ 7.77	0.068	0.795
PCT (D7, $\mu g/L, \bar{x} \pm s$)	5.13 $\pm$ 2.24	1.29 $\pm$ 0.38	4.242	0.046
CRP (D7, $mg/L, \bar{x} \pm s$)	62.70 $\pm$ 53.20	60.64 $\pm$ 49.19	0.173	0.680
IL-6 (D7, $ng/L, \bar{x} \pm s$)	28.25 $\pm$ 42.80	26.39 $\pm$ 10.66	1.867	0.179
TBIL (D7, μ mol/L, $\bar{x} \pm s$)	13.32 $\pm$ 10.09	13.14 $\pm$ 13.81	0.052	0.821
AGI 分级评分 [D7-D0, 分, $M(Q_L, Q_U)$]	0.0 (-1.5, 0.0)	-1.0 (-2.5, 0.0)	4.755	0.076
GIF 评分 [D7-D0, 分, $M(Q_L, Q_U)$]	0.0 (-1.0, 0.0)	-1.0 (-1.5, 0.0)	6.583	0.026
SOFA 评分 (D7, 分, $\bar{x} \pm s$)	5.60 $\pm$ 3.38	4.80 $\pm$ 2.21	1.504	0.269
APACHE II 评分 (D7, 分, $\bar{x} \pm s$)	16.27 $\pm$ 5.73	13.90 $\pm$ 3.45	4.956	0.032
28 d 病死率(%)	24.1	19.2	0.295	0.350
住院时间(d, $\bar{x} \pm s$)	18.40 $\pm$ 6.87	16.70 $\pm$ 5.63	2.315	0.136

注:对照组为给予安慰剂,观察组为给予益气活血解毒方;WBC 为白细胞计数,PCT 为降钙素原,CRP 为 C-反应蛋白,IL-6 为白细胞介素-6,TBIL 为总胆红素,AGI 为急性胃肠损伤,GIF 为胃肠功能衰竭评分,SOFA 为序贯器官衰竭评分,APACHE II 为急性生理学及慢性健康状况评分 II;D7 为治疗第 7 天,D7-D0 为治疗前与治疗第 7 天的差值

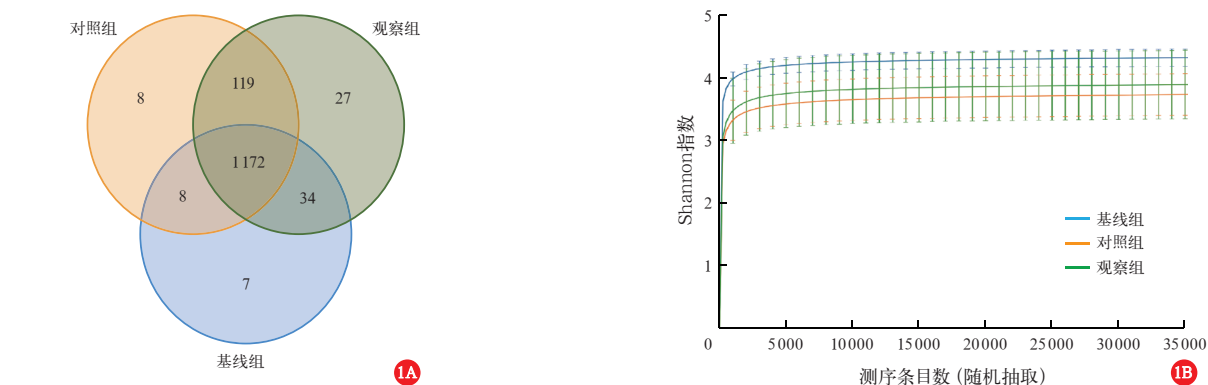
2.3 肠道菌群组成比较:治疗前留取到 30 例患者的粪便样本(基线组);治疗后留取到对照组 29 例患者的样本,观察组留取到 26 例患者的样本。

2.3.1 测序数据统计与评估(图 1):通过 Illumina NovaSeq 平台测序,85 个样本测序共获得 2 720 261 对 Reads,经质控归并共获得 1 375 个不同的 OTU。韦恩图显示,基线组、对照组和观察组分别有 1 221、1 307 和 1 352 个 OTU,有 1 172 个 OTU 为 3 组共有。观察组较对照组有更多的独有 OTU 数量,为 27 个。各组 Shannon 指数稀释曲线均接近饱和,表明测序深度已达预期。

2.3.2 α 多样性分析(表 3):对物种丰富度的衡量采用 Chao1 和 Ace 指数,对物种多样性的衡量采用 Shannon 和 Simpson 指数。结果显示,观察组和对照组 Simpson 指数均较基线组出现下降(均 $P < 0.05$),提示脓毒症患者治疗后菌群的多样性出现下降,但观察组与对照组相比差异无统计学意义。

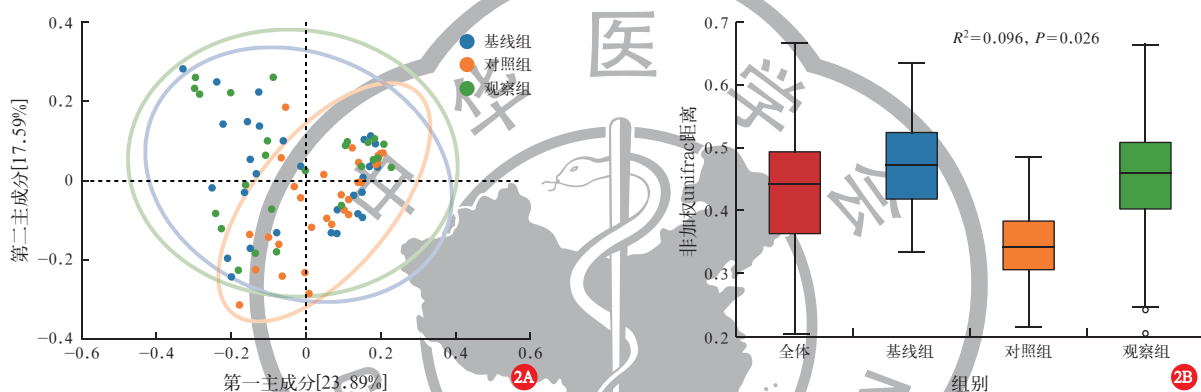
2.3.3 β 多样性分析(图 2):3 组间肠道菌群具有一定差异($R^2 = 0.096$, $P = 0.026$),表明联合益气活血解毒方治疗在一定程度上可调节脓毒症患者粪便菌群结构。

2.3.4 门水平物种构成分析(图 3A):在门水平上,整体丰度最高的 4 个菌门分别为厚壁菌门(53.69%)、放线菌门(16.23%)、变形菌门(15.39%)、拟杆菌门



注：基线组为所有患者治疗前粪便样本，对照组为安慰剂对照患者治疗后粪便样本，观察组为益气活血解毒方患者治疗后粪便样本

图 1 3 组老年肺源性脓毒症患者肠道菌群的差异操作分类单元(OTU)韦恩图(A)及 Shannon 指数稀释曲线(B)



注：A 为主坐标分析图；B 为置换多元方差分析结果；基线组为所有患者治疗前粪便样本，对照组为安慰剂对照患者治疗后粪便样本，观察组为益气活血解毒方患者治疗后粪便样本

图 2 3 组老年肺源性脓毒症患者肠道菌群 β 多样性分析

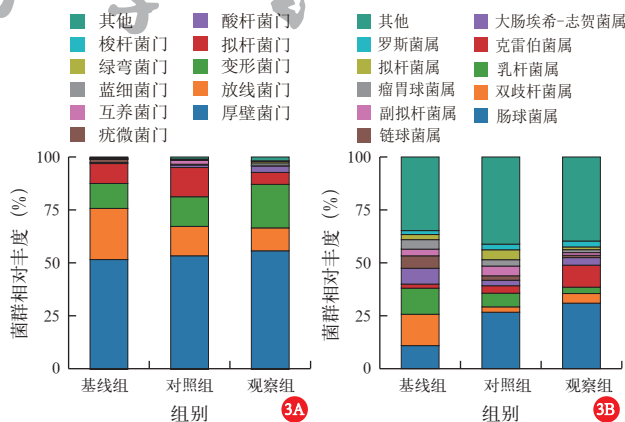
表 3 3 组老年肺源性脓毒症患者肠道菌群 α 多样性比较 [$M(Q_L, Q_U)$]

组别	样本数 (个)	Chao1 指数	Ace 指数
基线组	25	753.58 (753.00, 866.20)	948.24 (860.25, 1 064.42)
对照组	29	874.48 (785.24, 924.91)	888.49 (785.24, 924.91)
观察组	26	781.21 (611.14, 925.70)	909.35 (567.56, 1 075.46)
H 值		1.598	2.695
P 值		0.450	0.260
组别	样本数 (个)	Shannon 指数	Simpson 指数
基线组	25	4.28 (4.03, 4.75)	0.88 (0.87, 0.89)
对照组	29	3.52 (2.76, 4.37)	0.81 (0.32, 0.91) ^a
观察组	26	3.28 (2.62, 4.74)	0.75 (0.53, 0.91) ^a
H 值		3.567	1.123
P 值		0.168	0.570

注：基线组为所有患者治疗前粪便样本，对照组为安慰剂对照患者治疗后粪便样本，观察组为益气活血解毒方患者治疗后粪便样本；与基线组比较，^a $P < 0.05$

(9.57%)，但各菌门在基线组、对照组与观察组间差异无统计学意义。与对照组相比，观察组厚壁菌门、变形菌门、酸杆菌门、绿弯菌门的物种比例有增加趋势，拟杆菌门、放线菌门、互养菌门的物种比例有下降趋势。

2.3.5 属水平物种构成分析(图 3B)：在属水平上，整体丰度最高的菌属有肠球菌属(25.20%)、双歧杆菌属(6.24%)、乳杆菌属(6.03%)、克雷伯菌属(5.88%)、大肠埃希-志贺菌属(3.99%)、链球菌属(2.93%)、副拟杆菌属(2.82%)、瘤胃球菌属(2.65%)、拟杆菌属(2.55%)。



注：A 为门水平物种构成分析图；B 为属水平物种构成分析图；基线组为所有患者治疗前粪便样本，对照组为安慰剂对照患者治疗后粪便样本，观察组为益气活血解毒方患者治疗后粪便样本

图 3 3 组老年肺源性脓毒症患者肠道菌群物种构成

各组样本的物种丰度比较显示,共有 38 种细菌属的丰度在 3 组间差异存在统计学意义。其中,与对照组相比,观察组可显著提高欧陆森菌属($P=0.014$)、福涅拉菌属($P=0.013$)的丰度,降低拟杆菌属($P=0.009$)、嗜胆菌属($P=0.005$)、*Eggerthella* 菌属($P=0.002$)、柯林斯菌属($P=0.043$)的丰度。

2.3.6 肠道菌群 LEfSe 分析(图 4):对归一化的菌群丰度由门至种进行分析,结果显示,唾液乳杆菌及红蜡菌目下的奇异菌科中的欧陆森菌属为基线组与其他组的差异菌属;红蜡菌科的柯林斯菌属、互养菌门的互养菌纲的 *Cloacibacillus* 菌属在对照组显著富集;而观察组与其他组的差异物种为拟杆菌科的拟杆菌属。结合属水平差异基因分析结果,提示拟杆菌属、柯林斯菌属、欧陆森菌属可能为益气活血解毒方改善脓毒症胃肠功能障碍的潜在微生物关键治疗靶点。

3 讨论

脓毒症状态下剧烈的炎症反应、广泛的内皮损伤和缺血缺氧可导致胃肠屏障破坏、菌群失调及免疫功能紊乱。肠道菌群移位和内毒素释放可造成二次打击,进一步加剧器官损伤,形成恶性循环。因此,胃肠损伤也被称为脓毒症的“加速器”^[16]。老年患者因肠道菌群老化、免疫衰老及肺部感染后机械通气、广谱抗菌药物使用等因素,更易并发脓毒症及胃肠功能障碍^[17-18]。

益气活血解毒方是以“虚实辨治”为核心,基于老年肺源性脓毒症“虚”“毒”“瘀”的核心病机而拟定的专病专方,在活血通腑解毒的同时,兼以扶正药

贯穿其中。前期研究显示,益气活血解毒方可调整炎症免疫稳态,在抗炎的同时调整机体的细胞免疫功能,改善脓毒症患者的器官功能^[19]。在前期研究基础上,本研究进一步证实联合益气活血解毒方治疗老年肺源性脓毒症患者可降低血清 PCT 水平、胃肠损伤评分及重症评分;并通过 16S rDNA 测序对患者的肠道菌群进行系统分析,明确了联合益气活血解毒方治疗对老年肺源性脓毒症肠道菌群结构的影响,探索其关键治疗靶点。

肠道微生物群通过代谢、免疫调节及屏障功能维持宿主稳态,但其多样性在脓毒症及抗菌药物干预下显著下降^[20-21]。研究显示,肠道微生物群可以驱动机体的过度炎症反应,并影响脓毒症的治疗结果^[22]。多组学分析显示,肠道菌群构成和功能的变化与脓毒症相关的器官损伤也有着相互促进作用^[23]。临床研究证实,在 ICU 中抗菌药物的使用导致共生菌的菌种数量和丰度下降,使肠道微生物群的多样性显著下降^[24]。本研究也发现,观察组、对照组粪便菌群 Simpson 指数均低于基线组,表明患者入院后随着抗菌药物、质子泵抑制剂等治疗措施的使用,肠道菌群的 α 多样性下降;且 β 多样性的 PCoA 分析结果显示,3 组菌群结构存在差异,提示联合益气活血解毒方治疗在一定程度上可改变老年肺源性脓毒症患者的肠道菌群结构。

本研究显示,在对肠道菌群物种构成的门水平分析中,厚壁菌门与拟杆菌门同样为老年肺源性脓毒症患者的肠道优势菌群。拟杆菌门通过消化多糖产生短链脂肪酸参与免疫调节,而厚壁菌门释放的



注:基线组为所有患者治疗前粪便样本,对照组为安慰剂对照患者治疗后粪便样本,观察组为益气活血解毒方患者治疗后粪便样本;蓝色代表基线组与其他组差异显著的菌群;橙色代表对照组与其他组差异显著的菌群;绿色代表观察组与其他组差异显著的菌群

丁酸盐可促进肠上皮修复并诱导调节性 T 细胞分化。研究显示,拟杆菌门/厚壁菌门比值与脓毒症预后密切相关^[25]。随着年龄的增长,拟杆菌门/厚壁菌门比值呈现动态变化^[26];在脓毒症状态下,拟杆菌门/厚壁菌门比值的极端波动与不良预后相关^[27]。值得注意的是,粪菌移植可通过显著提升厚壁菌门丰度、降低炎症因子(如 IL-6、CRP)水平以改善脓毒症^[28-29]。本研究同样观察到,益气活血解毒方观察组厚壁菌门丰度增加,拟杆菌门/厚壁菌门比值显著下降,提示其调节肠道菌群的作用与粪菌移植存在相似的机制,可能通过抑制过度炎症反应改善患者预后。

菌群属水平分析表明,肠球菌属、双歧杆菌菌属、乳杆菌属、克雷伯菌属、大肠埃希-志贺菌属、链球菌属、副拟杆菌属、瘤胃球菌属及拟杆菌属为老年性肺源性脓毒症患者的优势菌属。联合益气活血解毒方治疗可显著提高欧陆森菌属、福涅拉菌属等有益菌丰度,同时抑制拟杆菌属、嗜胆菌属、*Eggerthella* 菌属及柯林斯菌属等致病菌的增殖。其中,欧陆森菌属作为奇异菌科专性厌氧菌,通过代谢产物肌苷激活 T 细胞腺苷 A₂A 受体,增强免疫调节并协同程序性死亡受体-1 抑制剂抗炎^[30];福涅拉菌属(瘤胃球菌科成员)通过产丁酸盐保护肠上皮屏障功能,其丰度恢复与抗生素相关腹泻的改善直接相关^[31-32]。在致病菌方面,拟杆菌属虽参与肠道代谢,但其丰度升高与血清肿瘤坏死因子- α 浓度及脓毒症肠外感染风险呈正相关^[33-35];嗜胆菌属与 *Eggerthella* 菌属则分别驱动代谢紊乱及菌血症风险^[36-37];柯林斯菌属通过代谢胆汁酸生成促炎产物,增加肠道通透性^[38]。LEfSe 分析进一步验证拟杆菌属、柯林斯菌属及欧陆森菌属为关键差异菌属,同时提示唾液乳杆菌属、*Cloacibacillus* 属可能与菌群重塑相关。上述结果提示,益气活血解毒方可能通过调节菌群平衡(促进有益菌/抑制致病菌),改善脓毒症胃肠屏障损伤及免疫炎症失衡,其机制或涉及菌群-代谢-免疫轴的多靶点调控。

综上所述,本研究证实了益气活血解毒方对老年肺源性脓毒症的临床改善作用,并初步揭示了其对肠道菌群的特异性调控效应,即通过提升欧陆森菌属、福涅拉菌属等有益菌丰度,抑制拟杆菌属、柯林斯菌属等致病菌增殖,重塑菌群-代谢-免疫轴平衡。该发现为揭示益气活血解毒方治疗脓毒症的有效性机制提供了关键线索,但需注意中医药多靶

点干预特征带来的研究复杂性,即在明确药效物质基础的同时,需整合宏基因组学、代谢组学等多维度数据,系统阐释菌群调控的生物学网络。需要注意的是,本研究受限于样本规模,后续拟扩大样本量验证核心菌属的治疗靶向性,并通过动物模型结合胆汁酸、短链脂肪酸等代谢产物检测,阐明该复方改善脓毒症胃肠损伤及免疫失衡的具体分子机制,以期构建中医药干预脓毒症菌群失调的“方-证-效”科学范式。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study [J]. *Lancet*, 2020, 395 (10219): 200–211. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)32989-7.
- [2] China Critical Care Clinical Trials Group (CCCCG). National incidence and mortality of hospitalized sepsis in China [J]. *Crit Care*, 2023, 27 (1): 84. DOI: 10.1186/s13054-023-04385-x.
- [3] Huang M, Cai SL, Su JQ. The pathogenesis of sepsis and potential therapeutic targets [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (21): 5376. DOI: 10.3390/ijms20215376.
- [4] 晋正敏, 朱琴, 龙云霞. 严重脓毒症/脓毒症休克患者预后的高危因素 [J/CD]. *中华肺部疾病杂志(电子版)*, 2020, 13 (5): 607–611. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-6902.2020.05.006.
- [5] 张家豪, 吕冰洁, 程翔. 肠道菌群通过调节免疫细胞参与肠外疾病的研究进展 [J]. *中华内科杂志*, 2024, 63 (1): 100–106. DOI: 10.3760/cma.j.cn112138-20231009-00195.
- [6] 陈曼玉, 宋烨闻, 黄烨. 脓毒症肠道微生物群紊乱与中医药防治 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2022, 29 (6): 750–754. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2022.06.025.
- [7] 雷萌萌, 张小亚, 杨小娟, 等. 基于 16S rRNA 测序技术分析呼吸机相关性肺炎患者粪便与肺泡灌洗液菌群的相关性 [J]. *中华危重病急救医学*, 2021, 33 (2): 169–173. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20201010-00662.
- [8] 彭晓洪, 宋紫, 黄永莲, 等. 针灸结合疗法对脓毒症患者肠道屏障功能保护作用的临床研究 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2023, 30 (2): 142–146. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2023.02.004.
- [9] 曹迎, 刘琳, 石嘉恒, 等. 胃肠复元法治疗脓毒症胃肠功能障碍的临床研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39 (8): 943–948. DOI: 10.7661/j.cjcm.20190408.048.
- [10] 汪磊, 刘阳, 李慧, 等. 中医药调节肠道菌群治疗脓毒症研究进展 [J]. *中国中医急症*, 2021, 30 (5): 924–927. DOI: 10.3969/j.issn.1004-745X.2021.05.050.
- [11] 李俊, 唐光华, 丁邦略, 等. 益气活血解毒方及其应用 [J]. *中国*, 2022, 11547052.1 [P]. 2024-06-18.
- [12] Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016 [J]. *Crit Care Med*, 2017, 45 (3): 486–552. DOI: 10.1097/CCM.0000000000002255.
- [13] 中国中西医结合学会急救医学专业委员会. 《中国中西医结合急救杂志》编辑委员会. 脓毒症中西医结合诊治专家共识 [J]. *中华危重病急救医学*, 2013, 25 (4): 194–197. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.04.002.
- [14] 中华医学会呼吸病学分会. 中国成人社区获得性肺炎诊断和治疗指南 (2016 年版) [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2016, 39 (4): 253–279. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2016.04.005.
- [15] 中华医学会呼吸病学分会感染学组. 中国成人医院获得性肺炎与呼吸机相关性肺炎诊断和治疗指南 (2018 年版) [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2018, 41 (4): 255–280. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2018.04.006.
- [16] 上海市中西医结合学会急救医学专业委员会, 上海市中西医结合学会重症医学专业委员会, 上海市医师协会急诊科医师分会, 等. 脓毒症急性胃肠功能障碍中西医结合临床专家共识 [J]. *中华危重病急救医学*, 2022, 34 (2): 113–120. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20211216-01880.
- [17] He WX, Xiao K, Fang M, et al. Immune cell number, phenotype, and function in the elderly with sepsis [J]. *Aging Dis*, 2021, 12 (1): 277–296. DOI: 10.14336/AD.2020.0627.
- [18] Colbert JF, Kirsch JM, Erzen CL, et al. Aging-associated

- augmentation of gut microbiome virulence capability drives sepsis severity [J]. mBio, 2023, 14 (3): e0005223. DOI: 10.1128/mbio.00052-23.
- [19] 邓雅文, 曾瑞峰, 徐艺萌, 等. 益气活血散干预脓毒症关键基因和核心通路的生物信息学研究 [J]. 基因组学与应用生物学, 2024, 43 (8): 1469-1482. DOI: 10.13417/j.gab.043.001469.
- [20] 靳贺, 管力, 罗世兰, 等. 肠道菌群及其代谢产物在宿主抵御感染中的作用及机制 [J]. 中华危重病急救医学, 2024, 36 (3): 326-331. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20231011-00860.
- [21] Niu MW, Chen P. Crosstalk between gut microbiota and sepsis [J]. Burns Trauma, 2021, 9: tkab036. DOI: 10.1093/burnst/tkab036.
- [22] Liu Z, Li N, Fang H, et al. Enteric dysbiosis is associated with sepsis in patients [J]. FASEB J, 2019, 33 (11): 12299-12310. DOI: 10.1096/fj.201900398RR.
- [23] 张萍, 杨磊, 卓玉珍, 等. 运用 16s rRNA 和非靶代谢组学揭示肠道菌群在脓毒症免疫调节及器官损伤中的作用 [J]. 中华危重病急救医学, 2023, 35 (9): 927-932. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20230517-00378.
- [24] Ravi A, Halstead FD, Bamford A, et al. Loss of microbial diversity and pathogen domination of the gut microbiota in critically ill patients [J]. Microb Genom, 2019, 5 (9): e000293. DOI: 10.1099/mgen.0.000293.
- [25] Kim S, Covington A, Pamer EG. The intestinal microbiota: antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens [J]. Immunol Rev, 2017, 279 (1): 90-105. DOI: 10.1111/imr.12563.
- [26] Mariat D, Firmesse O, Levenez F, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age [J]. BMC Microbiol, 2009, 9: 123. DOI: 10.1186/1471-2180-9-123.
- [27] Ojima M, Motooka D, Shimizu K, et al. Metagenomic analysis reveals dynamic changes of whole gut microbiota in the acute phase of intensive care unit patients [J]. Dig Dis Sci, 2016, 61 (6): 1628-1634. DOI: 10.1007/s10620-015-4011-3.
- [28] Wei YL, Yang J, Wang J, et al. Successful treatment with fecal microbiota transplantation in patients with multiple organ dysfunction syndrome and diarrhea following severe sepsis [J]. Crit Care, 2016, 20 (1): 332. DOI: 10.1186/s13054-016-1491-2.
- [29] Li Qr, Wang Cy, Tang C, et al. Successful treatment of severe sepsis and diarrhea after vagotomy utilizing fecal microbiota transplantation: a case report [J]. Crit Care, 2015, 19 (1): 37. DOI: 10.1186/s13054-015-0738-7.
- [30] Mager LF, Burkhard R, Pett N, et al. Microbiome-derived inosine modulates response to checkpoint inhibitor immunotherapy [J]. Science, 2020, 369 (6510): 1481-1489. DOI: 10.1126/science.abc3421.
- [31] Togo AH, Durand G, Khelaifia S, et al. *Fournierella massiliensis* gen. nov., sp. nov., a new human-associated member of the family Ruminococcaceae [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2017, 67 (5): 1393-1399. DOI: 10.1099/ijsem.0.001826.
- [32] Gu XQ, Sim JXY, Lee WL, et al. Gut Ruminococcaceae levels at baseline correlate with risk of antibiotic-associated diarrhea [J]. iScience, 2021, 25 (1): 103644. DOI: 10.1016/j.isci.2021.103644.
- [33] 孙慧鑫. 妊娠糖尿病孕妇肠道菌群和炎症因子及 T 细胞亚群分析 [J]. 实用检验医师杂志, 2023, 15 (1): 22-25. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2023.01.006.
- [34] 赵赫, 匡重伸, 李芳, 等. 脓毒症模型小鼠的肠道菌群组成与变化 [J]. 中华危重病急救医学, 2021, 33 (1): 10-16. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200814-00579.
- [35] Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, et al. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality [J]. J Immunol, 2006, 177 (3): 1967-1974. DOI: 10.4049/jimmunol.177.3.1967.
- [36] Zhang HY, Jiang XZ, Li AZ, et al. Causal associations between gut microbiota and cerebrovascular diseases [J]. World Neurosurg, 2024, 183: e587-e597. DOI: 10.1016/j.wneu.2023.12.150.
- [37] Bo JS, Wang S, Bi YN, et al. *Eggerthella lenta* bloodstream infections: two cases and review of the literature [J]. Future Microbiol, 2020, 15: 981-985. DOI: 10.2217/fmb-2019-0338.
- [38] Astbury S, Atallah E, Vijay A, et al. Lower gut microbiome diversity and higher abundance of proinflammatory genus *Collinsella* are associated with biopsy-proven nonalcoholic steatohepatitis [J]. Gut Microbes, 2020, 11 (3): 569-580. DOI: 10.1080/19490976.2019.1681861.

(收稿日期: 2024-08-20)
(责任编辑: 保健媛 李银平)

• 科研新闻速递 •

对接受大型胃肠道手术的患者进行心排量指导下血流动力学治疗: OPTIMISE II 随机临床试验

据估计,全球每年有 3.1 亿患者接受手术治疗。接受胃肠道手术的老年合并症患者的术后发病率尤其高。通过监测心排量进行规范化的血流动力学管理是一种可以降低术后感染和其他并发症风险、改善患者护理的方法。近期全球多国学者共同进行了一项多中心随机对照试验 (OPTIMISE II), 旨在评估对接受大型胃肠道手术的患者进行围手术期心排量指导血流动力学治疗算法的临床有效性和安全性。OPTIMISE II 是一项国际多中心随机试验, 在英国 (14 家)、西班牙 (9 家)、巴西 (7 家)、加拿大 (5 家)、美国 (5 家)、德国 (4 家)、波兰 (4 家)、澳大利亚 (3 家)、瑞士 (2 家)、约旦 (1 家) 和罗马尼亚 (1 家) 等 55 家医院进行。研究纳入 2017 年 1 月至 2022 年 9 月 2 498 例年龄 ≥ 65 岁、美国麻醉医师协会身体状况分级 II 级或以上、正在接受择期胃肠道大手术的患者。患者被随机分配到干预治疗组 (在手术期间及手术后 4 h 内进行微创心排量引导的静脉输液治疗, 并低剂量使用正性肌力药物) 或接受无心排量监测的常规治疗组。主要结局是随机分组后 30 d 内的术后感染; 次要结局为 30 d 内的急性肾损伤和 180 d 内的病死率; 安全性结局为 24 h 内和 30 d 内的急性心脏事件。结果显示: 在 2 498 例患者 [平均年龄 (74 $\pm$ 6) 岁, 57% 为女性] 中, 23.2% (289/1 247) 的干预治疗组患者和 22.7% (283/1 247) 的常规治疗组患者出现了主要结局 [调整后的优势比 (aOR) = 1.03, 95% 可信区间 (95%CI) 为 0.84 ~ 1.25, $P=0.81$]。3.0% (38/1 250) 的干预治疗组患者和 1.7% (21/1 247) 的常规治疗组患者在 24 h 内发生急性心脏事件 (aOR = 1.82, 95%CI 为 1.06 ~ 3.13, $P=0.03$)。这一差异主要是由于干预治疗组患者心律失常发生率增加所致。6.8% (85/1 249) 的干预治疗组患者和 6.3% (79/1 247) 的常规治疗组患者在 30 d 内发生急性心脏事件 (aOR = 1.06, 95%CI 为 0.77 ~ 1.47, $P=0.71$)。其他次要结局差异无统计学意义。研究人员据此得出结论: 这项针对接受重大择期胃肠手术患者的临床有效性试验未能提供证据表明心排量指导的静脉输液治疗与低剂量正性肌力药物输注能够减少术后感染发生率。该干预与 24 h 内急性心脏事件发生率增加相关, 特别是快速性心律失常。基于这些发现, 不建议在未经选择的患者中常规使用这种治疗方法。

蒋佳维, 李银平, 编译自《BMJ》, 2024, 387: e080439