研究论文

DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2017.06.004

蔗糖对七味白术散治疗菌群失调腹泻小鼠肠道细菌多样性的影响

蒲俊安[1]，郑 淘[1]，李 灿[1]，彭昕欣[2]，舒 兰[2]，谭周进[1]，吴永根[1]，肖嫩群[*1]

（1. 湖南中医药大学 湘杏学院，湖南 长沙 410208；2. 湖南中医药大学 第一附属医院，湖南 长沙 410007）

摘要：为了明确蔗糖对七味白术散治疗菌群失调腹泻小鼠肠道细菌多样性的影响，将48只SPF级小鼠随机分成4组，正常组小鼠灌胃无菌盐水，以头孢拉定、硫酸庆大霉素混合灌胃小鼠构建菌群失调腹泻模型，然后分别灌胃无菌盐水、七味白术散50%量超微汤药、七味白术散50%量超微汤药加糖，治疗结束后，提取肠道微生物宏基因组，通过扩增核糖体DNA限制性酶切片段分析（ARDRA）技术研究肠道细菌多样性，判断药效。结果表明，七味白术散50%量超微汤药组、七味白术散50%量超微汤药加糖组及正常组的条带数和OTU数均为6，多样性指数分别为2.322、2.585、2.585；相似系数分别为0.363 6、0.277 8、1.000 0；从相似系数分析发现，七味白术散50%量超微汤药加糖组相似系数低于七味白术散50%量超微汤药组；聚类分析、主成分分析表明，七味白术散50%量超微汤药组较七味白术散50%量超微汤药加糖组更接近正常组，说明七味白术散50%量超微汤药组与七味白术散50%量超微汤药加糖组均能治疗小鼠菌群失调腹泻，且七味白术散50%量超微汤药组对小鼠的治疗效果优于七味白术散50%量超微汤药加糖组。七味白术散在临床用药时不加蔗糖更理想。

关键词：七味白术散；蔗糖；细菌多样性；ARDRA；肠道微生物

中图分类号：R 331.34　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1673—1689(2017)06—0583—07

Effect of Sucrose on Qiweibaishusan to Intestinal Bacteria Diversity in Dysbacteriotic Diarrhea Mice

PU Junan[1]，*ZHENG Tao*[1]，*LI Can*[1]，*PENG Xinxin*[2]，*SHU Lan*[2]，*TAN Zhoujin*[1]，*WU Yonggen*[1]，*XIAO Nenqun*[*1]

（1. Xiangxin Institute，Hunan University of Chinese Medicine，Changsha 410208，China；2.The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine，Changsha 410007，China）

Abstract：In order to evaluate the effect of sucrose on Qiweibaizhusan to intestinal bacteria diversity in dysbacteriotic diarrhea mice，48 SPF mice were randomized into 4 groups. Normal control group

收稿日期：2015-07-14

基金项目：国家自然科学基金项目（81573951）；湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划基金项目（湘教通〔2015〕269号）。

* **通信作者**：肖嫩群（1975—），女，湖南宁乡人，农学硕士，高级实验师，主要从事中药资源及微生态学方面的研究。

E-mail：xiaonenqun@sohu.com

引用本文：蒲俊安，郑淘，李灿，等. 蔗糖对七味白术散治疗菌群失调腹泻小鼠肠道细菌多样性的影响[J]. 食品与生物技术学报，2017，36（06）：583-589.

of mice were via intragastric administration of sterile water. Model group and treated groupmice were constructed via intragastric administration of cefradine and gentamycin sulfate. Model group mice were via intragastric administration of sterile water,and treatment groups were via intragastric administration of 50% amount of ultra- micro Qiweibaizhusan powder and 50% amount of ultra-micro Qiweibaizhusan powder with 8% sugar respectively. After treatment,intestinal microbiotia metagenome DNA were extracted. The intestinal bacteria diversity was analyzed by amplified ribosomal DNA restriction analysis. The results showed that OTU and stripe numbers in 50% amount of ultra-micro powder Qiweibaizhusan group,50% amount of ultra-micro powder Qiweibaizhusan with sucrose group and normal control group were all 6. The diversity index in 50% amount of ultra-micro powder Qiweibaizhusan group,50% amount of ultra-micro powder Qiweibaizhusan with sucrose group and normal control group were respectively 2.322,2.585 and 2.585. The same similarity coefficient in 50% amount of ultra-micro powder Qiweibaizhusan group, 50% amount of ultra-micro powder Qiweibaizhusan with sucrose group and normal control group were respectively 0.363 6,0.277 8 and 1.0000. The similarity coefficient in 50% amount of ultra-micro powder Qiweibaizhusan with sucrose group is lower than that in 50% amount of ultra-micro powder Qiweibaizhusan group. Cluster analysis and principal component analysis showed that 50% amount of ultra-micro powder Qiweibaizhusan group were better than 50% amount of ultra-micro powder Qiweibaizhusan with sucrose group to normal control group. Both 50% amount of ultra-micro powder Qiweibaizhusan and 50% amount of ultra-micro powder Qiweibaizhusan with sucrose could cure dysbacteriosis diarrhea. The former had better effect than the latter. It was advised to adopt the ultra-micro powder Qiweibaizhusan without the additive of sucrose.

Keywords: Qiweibaizhusan,sucrose,bacteria diversity,ARDRA,intestinal microbiotia

小儿腹泻发病率在我国小儿疾病中仍高居第二位,仅次于呼吸道感染[1-2],是我国儿童保健重点防治的“四病”之一[3],是全球儿童的主要致病致死因素[4]。门诊儿童患者中抗生素相关性腹泻(antibiotic-associated diarrhea,AAD)的发生率达6.2%[5]。AAD存在肠道微生态失调,AAD主要是由于抗生素的使用扰乱了肠道菌群的生态平衡而引起[6-7],研究和使用对AAD有疗效的中药可以避免使用抗生素治疗该病的恶性循环,具有重要意义。

七味白术散平和中正,补泻互藏,相反相成,药简力专,正中儿童腹泻病机的本质,对AAD疗效确切[8-9]。七味白术散含有多糖、黄酮、异黄酮、氨基酸、甾醇、酪氨酸酶等活性成分,在抑制或杀灭有害菌群、促进有益菌群增殖、调节消化道微生物区系的平衡上发挥着重要作用[10-11]。肠道是一个多元化和充满活力的微生态系统,肠道菌种丰富,与机体相互作用,对健康影响尤为重要[12]。中药口感不佳,服药的依从性差一直是限制中医药发展的重要因素,通常在中药服用或制剂研制中添加甜味剂来改变口味[13]。蔗糖在制剂中起着赋形和矫味剂的作用[14],常在中药使用中用做甜味剂。中医认为,蔗糖滋润心肺、疏肝理气、健脾和中[15]。为明确使用蔗糖改善口味是否影响中药药效,作者应用扩增核糖体DNA限制性酶切片段分析 (Amplifed Ribosomal DNA Restriction Analysis,ARDRA)技术[16]研究蔗糖对七味白术散治疗菌群失调腹泻小鼠肠道细菌多样性的影响,为七味白术散服用过程中甜味剂的选用提供依据,指导临床用药。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 *动物* SPF级昆明小鼠48只,雌雄各半,体质量(20±2) g,由上海斯莱克斯实验动物有限公司提供。动物许可证号:SCXK(湘)2011-0003。

1.1.2 饲料 由湖南中医药大学动物实验中心提供,为小鼠常规饲料配方。

1.1.3 实验环境 由湖南中医药大学动物实验中心提供,SPF 级动物房。

1.1.4 药物 七味白术散药物按照《中华人民共和国药典》(2010 版)处方:白茯苓 10 g(产于云南省)、炒白术 10 g(产于浙江省)、人参 6 g(产于吉林省)、木香 6 g(产于云南省)、藿香叶 10 g(产于广西省)、葛根 10 g(产于湖南省)、甘草 3 g(产于内蒙古自治区),以上同批次药物经湖南中医药大学肖冰梅教授鉴定后,均购自湖南中医药大学第一附属医院门诊超微饮片中心。

七味白术散 50%量超微汤药组的制备:将单味中药超微粉碎成 0.01~500 μm,按上述剂量的 50%量称取超微粉,加入温水冲泡、搅拌均匀,冷却药液后以 200 r/min 离心,上清液即为七味白术散 50%量超微汤药组,4 ℃保存,临用前复温至 25~30 ℃。

七味白术散 50%量超微汤药加糖组的制备:按上述方法制备成七味白术散 50%量超微汤药,临用前复温至 25~30 ℃,加入蔗糖 8 g/dL,拌匀为七味白术散 50%量超微汤药加糖组。

蔗糖用量为 8 g/dL,常人喜欢的甜度,糖溶液质量浓度在 10~25 g/dL 之间[17]。考虑到七味白术散中的甘草,其本身就是一种天然甜味剂,经甜味试验后,蔗糖的用量为 8 g/dL 合适。

硫酸庆大霉素注射液、头孢拉定胶囊,用无菌生理盐水配成质量浓度为 62.5 g/L 的抗生素混合液,即 6 支庆大霉素(2 mL)+3 粒头孢拉定(0.25 g)配制成混合液,4 ℃保存备用。

1.1.5 试剂 溶菌酶、蛋白酶 K、dNTP、*Taq* 酶、高效离心柱型琼脂糖凝胶回收试剂盒、限制性内切酶 *Sam* I、*Hind* III、*Hha* I 和 *Rsa* I、细菌通用引物[18]27F(5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′)、1492R(5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′)等:北京鼎国昌盛生物技术公司;0.1 mol/L PBS(pH 7.4)、Tris 缓冲液、0.5 mol/L EDTA、TE 缓冲液、10 mg/mL RnaseA、10% SDS、3 mol/L 乙酸钠、24:1 的氯仿/异戊醇(V/V)、70%乙醇、10×TBE 缓冲液、10×*Taq* 缓冲液、1 g/dL 琼脂糖凝胶:参照文献[19]配制。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 课题组已有研究证明,50%量超微七味白术散的疗效能够达到传统七味白术散全量的疗效。本研究所用 48 只小鼠适应性喂养 3 d 后,采用随机数字表法进行分组,共分为 4 组,即:正常组、模型组、七味白术散 50%量超微汤药组、七味白术散 50%量超微汤药加糖组,每组 12 只,雌雄各半,分笼饲养。

1.2.2 造模方法 根据文献[20]进行造模,正常组给予无菌生理盐水 0.35 mL/(只·次)灌胃,模型组和两个药物组采用抗生素混合液 0.35 mL/(只·次)灌胃,每天 2 次,连续 5 d,直至粪便稀湿。

1.2.3 给药治疗 造模成功后,正常组及模型组给予无菌生理盐水,其余两药物组按临床等效用药剂量灌胃给药,连续 3 d,每天 2 次[11]。

1.2.4 小鼠肠道内容物的提取 给药治疗完成后,使用颈椎脱臼法处死小鼠,随即在超净工作台上无菌操作,收集各小鼠空肠至回肠段肠道内物质,同组每雌雄 2 只小鼠的肠道内物质收集在一起,将样品置于冰上,并立即带回实验室,置于-20 ℃低温环境中保存备用。

1.2.5 样品预处理 参照文献制作方法[20-21],取 2.0 g 小鼠肠道内容物质放入 50 mL 无菌离心管,加入 30 mL、0.1 mmol/L PBS 和直径为 0.3 mm 的无菌玻璃珠,混匀,200 *g* 离心 2 min 后取上清液,重复洗涤 2 次;混合上清液,10 000 *g* 离心 8 min,弃置上清液;用 PBS 洗涤 1 次沉淀、用丙酮洗涤 2 次、PBS 洗涤 3 次,再重悬在 4 mL TE 缓冲液中(pH 8.0)备用。

1.2.6 肠道菌群宏基因组的提取 肠道微生物宏基因组的提取参照吴海[21-22]的方法优化进行。取 500 μL 预处理后的菌悬液于 1.5 mL 无菌离心管,加入 45 μL TE 缓冲液、5 μL 蛋白酶 K 和 20 μL 溶菌酶,37 ℃反应 30 min 后加入 30 μL 10% SDS,混匀,37 ℃反应 40 min,每 10 分钟振摇一次。加入 100 μL、5 mol/L NaCl 混匀;加入 80 μL CTAB/NaCl 混匀,65 ℃反应 10 min。按上述方法经 Tris-饱和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提等步骤提取 DNA,保存备用。

1.2.7 宏基因组特异性引物 PCR 扩增 PCR 反应体系:10×PCR 缓冲液 5 μL,dNTP 4 μL,引物各 1 μL,DNA 模板 2 μL,*Taq* 酶(2.5 U/μL)1 μL,无菌水补足 50 μL。PCR 扩增必要前提:94 ℃变性 5 min,94 ℃变性 45 s、52 ℃退火 45 s、72 ℃持续 90 s,经过 36 个循环,最后 72 ℃持续 10 min。PCR 产物用 0.7 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测观察分析后,保

存于 4 ℃冰箱中待用。

1.2.8 对 PCR 产物进行胶回收 按照高效离心柱型琼脂糖凝胶回收试剂盒“NEP025-1”说明书进行。

1.2.9 扩增核糖体限制性酶切片断分析 酶切 PCR 产物:*Hha* I、*Rsa* I、*Sam* I 和 *Hind* III;反应体系为:dd H_2O 12 μL,PCR 产物 10 μL,10×酶解缓冲液 2 μL,*Hha* I、*Rsa* I、*Sam* I 和 *Hind* III 酶各 2 μL。在 37 ℃恒温反应 4 h 后,经 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳、EB 染色、凝胶成像仪观察分析。

1.3 数据分析

1.3.1 多态性分析 ARDRA 带型视为一个 OTU,用 Quantity One 软件将琼脂糖凝胶上出现的 DNA 片段转化成分子量信息,按“出现”记为“1”,“不出现”记为“0”,进行统计。(模糊条带和小于 100 bp 的条带忽略不计)。

1.3.2 多样性的测度 参照文献[23],使用 Quantity One 软件进行条带分析,琼脂糖凝胶上 DNA 片段按“不出现”记为 0,“出现”记为 1,进行统计分析,用 DPS v7.05、NTSYS-PC 软件计算多样性指数、相似系数:

$$\text{Shannon 指数}(H'):H'=-\sum_{i=1}^{S}(n_i/N\ln(n_i/N)) \quad (1)$$

式中:S 为物种的总数,n_i 为第 i 个物种个体数目,N 为群落中物种个体总数。ni/N 为第 i 个物种数比群落总数。这个公式表明,群落中生物种类与群落复杂性呈正相关,即 H 值与群落所含的信息量成正比。

$$\text{Brillouin 指数}(H):H=\frac{1}{N}\ln\frac{N!}{n_1!\ n_2!\ n_3!} \quad (2)$$

式中:n_1 为抽样中第一个物种的个体数,n_2 为抽样中第二个物种的个体数,n_3 为抽样中第三个物种的个体数,依次类推,N 为抽样中所有物种的个体总和。

$$\text{Czekanowski}(Cs):Cs=2j\times\frac{1}{(a+b)\times100} \quad (3)$$

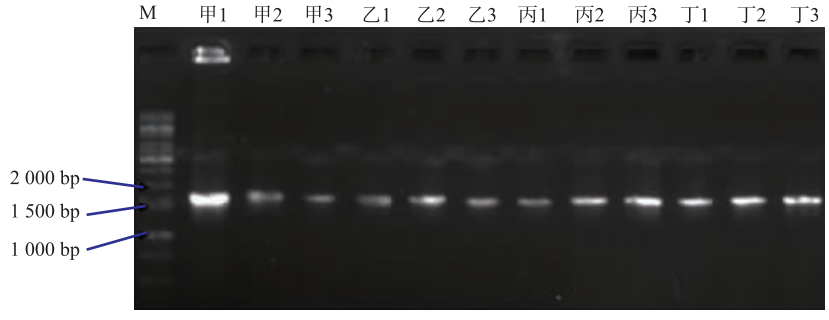
式中:a 为某样品的酶切图谱的条带数目,b 则为另一样品的酶切图谱的条带数目,j 为两个泳道所共有条带的数目。完全相同的两个图谱的相似系数为“1”,而完全不同的两个图谱其相似系数为“0”。

1.3.3 构建聚类树、分析主成分 采用 SPSS19.0 版本软件处理数据,构建聚类树以及进行主成分分析。

2 结果与讨论

2.1 肠道菌群宏基因组 DNA 细菌特异引物 PCR 电泳图

将 PCR 后产物用 0.7 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测观察,见图 1。经过与 Mark 比对分析,肠道细菌 16S rDNA 约为 1 500 bp 左右,且条带稳定清晰。



M:Mark,;甲 1~甲 3:正常组;乙 1~乙 3:模型组;丙 1~丙 3:七味白术散 50%量超微汤药组;丁 1~丁 3:七味白术散 50%量超微汤药加糖组

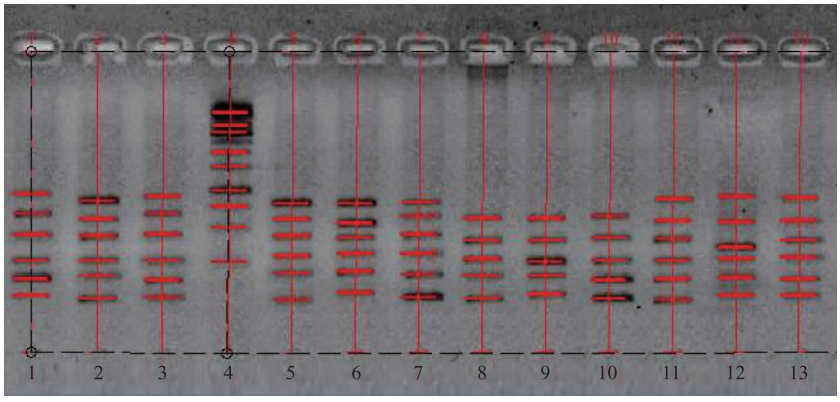
图 1 小鼠肠内菌群宏基因组 DNA 的细菌 16S rDNA 扩增电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of amplified 16SrDNA from intestinal bacteria metagenome in mice

2.2 肠内菌群宏基因组的细菌 PCR 产物酶切后 ARDRA 分析

将 PCR 产物经过 *Hha* I、*Rsa* I、*Sam* I 和 *Hind* III 酶切后,采用 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳,通过 Quantity One 软件进行条带分析,结果见图 2。将每一个 DNA 限制性片段长度多态性类型归纳为同一

个 OUTs,OUTs 多用以估计分离物中存在的最低限度的菌种的数目。各组 OUTs 数见表 1。正常组、七味白术散 50%量超微汤药组、七味白术散 50%量超微汤药加糖组 OTUs 数均为 6,该三组 OTUs 数无差异,模型组 OTUs 数为 5。由此说明菌群失调腹泻造模影响小鼠肠道微生物,造成菌群失调。经七味白术散 50%量超微汤药组和七味白术散 50%量超微汤药加糖组治疗,可调整小鼠肠道菌群,接近正常组水平,提示基本上恢复正常。在条带数、OTU 数上分析,七味白术散 50%量超微汤药组和七味白术散 50%量超微汤药加糖组治疗无明显差异。



1~3:七味白术散 50%量超微汤药加糖组;4:MARK ;5~7:正常组;8~10:模型组;11~13:七味白术散 50%量超微汤药组。

图 2　Quantity One 软件分析条带数

Fig. 2　Results of Quantity One

表 1　各组小鼠肠道细菌 ARDRA 的 OTUs 数

Table 1　OTUs from ARDRA of intestinal bacteria in mice

组别	OTUs 数
正常组	6
模型组	5
七味白术散 50%量超微汤药组	6
七味白术散 50%量超微汤药加糖组	6

2.3　小鼠肠内细菌多样性指数和相似系数

Shannon 多样性指数(H')和 Brillouin(H)越大,菌群所含的信息量就越大,生物种类就更多,说明菌落的复杂程度愈高。Czekanowski 相似性系数(Cs)越大,表示菌群多样性越相似。经 SPSS19.0、NTSYS-PC 软件分析,小鼠肠道菌群多样性指数和相似系数见表 2。正常组、模型组、七味白术散 50%量超微汤药加糖组 Shannon 指数和 Brillouin 指数均相同,说明三组的多样性相同。七味白术散 50%量超微汤药组的相似度系数大于七味白术散 50%量超微汤药加糖组,大于模型组,大于正常组。虽然七味白术散 50%量超微汤药加糖组与正常组多样性无差别,且优于七味白术散 50%量超微汤药组,但其相似系数低于七味白术散 50%量超微汤药组,说明经七味白术散 50%量超微汤药加糖组治疗的细菌种类恢复程度劣于七味白术散 50%量超微汤药组,故从细菌多样性指数及相似系数角度分析,七味白术散 50%量超微汤药组的疗效优于七味白术散 50%量超微汤药加糖组。

表 2　小鼠肠内细菌多样性指数和相似系数

Table 2　Diversity and similarity index of mice

组别	Shannon (H')	Brillouin (H)	Czekanowski (Cs)
正常组	2.585	1.582	1.000 0
模型组	2.585	1.582	0.222 2
七味白术散 50%量超微汤药组	2.322	1.381	0.363 6
七味白术散 50%量超微汤药加糖组	2.585	1.582	0.277 8

2.4　小鼠肠内细菌聚类分析及主成分分析

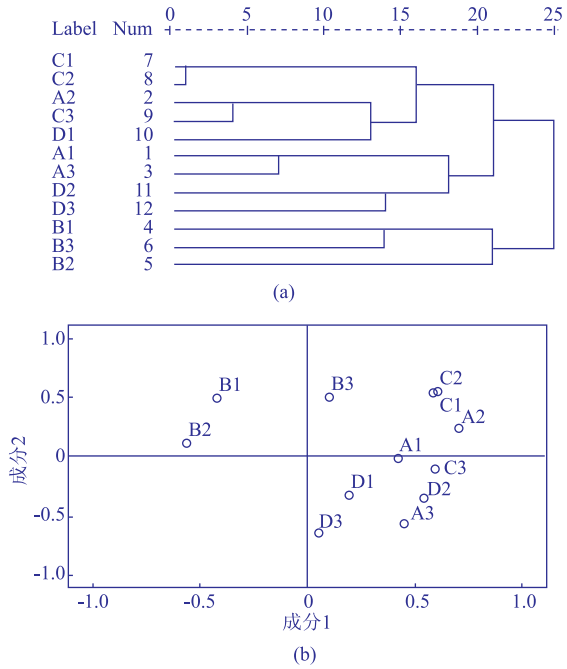
UPGMA 分析后,得到聚类树,见图 3(a)。由图 3 可知,被聚为同一类的各组小鼠肠道菌落结构和数量最接近,聚类距离越小,越接近正常组,疗效越好。当聚类距离为 15,小鼠肠内菌群可分为 6 类:C1、C2 聚为同类;A2、C3、D1 聚为同类;A1、A3 聚为同类;D2、D3 聚为同类;B1、B3 聚为同类;B2 聚为同类。当距离大于等于 20 并小于 25 时,小鼠肠内菌群可聚为两类,ACD 聚为同类,B 单独一类。菌群失调腹泻造模使得小鼠肠道细菌多样性发生改变,经

七味白术散 50%量超微汤药加糖组和七味白术散 50%量超微汤药组药物治疗，菌群多样性得到一定的调整，接近正常组水平，说明七味白术散 50%量超微汤药加糖组和七味白术散 50%量超微汤药组药物治疗对菌群失调腹泻有疗效。当距离大于或等于 15 并小于 20，小鼠肠内菌群可聚为 4 类：C1、C2、A2、C3 聚为同类；A1、A3、D2、D3 聚为同类；B1、B3 聚为同类；B2 聚为同类。可知 a 与 c 的聚类距离要小于 a 与 d 的聚类距离，提示七味白术散 50%量超微汤药组的疗效优于七味白术散 50%量超微汤药加糖组。

各组小鼠肠道细菌菌群主成分分析见图 3(b)，各组分别分布于除第三象限外的其他三个象限，正常组和七味白术散 50%量超微汤药组位于第一和第四象限，模型组位于第一和第二象限，七味白术散 50%量超微汤药加糖组位于第四象限。七味白术散 50%量超微汤药组中 3 个重复对主成分 1 贡献率最接近，其他各组内 3 个重复对主成分 1 或 2 的贡献率差别较大。对主成分 1 贡献率由大到小分别为：$A_2>C_1\approx C_3\approx C_2>B_2\approx D_2>A_3>A_1>B_1>D_1>B_3>D_3$，对主成分 2 贡献率由大到小分别为：$D_3>C_2\approx C_1\approx A_3>B_1\approx B_3>D_2>D_1>A_2>B_2>C_3>A_1$。总体上 C 组较 D 组更接近正常组，由此推论，从小鼠肠道细菌菌群主成分角度分析，七味白术散 50%量超微汤药组比七味白术散 50%量超微汤药加糖组更接近正常组。

3 结 语

小鼠肠内菌群宏基因组 PCR 产物酶切后经 ARDRA 技术和统计分析，OTUs、多样性指数(H')和 Brillouin (H)，以及所进行的聚类分析和主成分分析，均显示造模使小鼠肠内菌落多样性遭到破坏，使得小鼠肠内微生物的数量和结构改变。七味白术散是健脾法的代表方[24]，临床合理应用，可以有效地发挥中医药的优势，缩短腹泻的时间，有益孩子们的康复。现代药理研究也表明，七味白术散具备丰富的中药化学成分，功能多样，这些成分同时对肠道微生物具有极其重要的作用[25]。



A1~A3：正常组；B1~B3：模型组；C1~C3：七味白术散 50%量超微汤药组；D1~D3：七味白术散 50%量超微汤药加糖组。

图 3 小鼠肠道内细菌的聚类分析(a)和主成分分析(b)

Fig. 3 Cluster analysis (a) and principal components analysis (b) of intestinal bacteria in mice

本课题组前期研究发现，七味白术散可以恢复肠道菌群失衡[11]。从条带数、OTU 数上分析，七味白术散 50%量超微汤药组和七味白术散 50%量超微汤药加糖组治疗肠道菌群失衡均有效，二者无明显疗效差异。从多样性指数、相似性指数分析，虽然七味白术散 50%量超微汤药加糖组与正常组多样性无差别，但七味白术散 50%量超微汤药加糖组其相似系数低于七味白术散 50%量超微汤药组，说明经七味白术散 50%量超微汤药加糖组治疗腹泻肠道细菌种类恢复程度不如七味白术散 50%量超微汤药组。从聚类分析、主成分分析角度提示七味白术散 50%量超微汤药组的疗效优于七味白术散 50%量超微汤药加糖组。综上可知，治疗疗效从肠道细菌多样性角度分析，七味白术散 50%量超微汤药加糖组不及七味白术散 50%量超微汤药组。

参考文献：

[1] ACKEMANN G,THOMALLA S,ACKEMANN F. et a1. Prevalence and characteristics of bacteria and host factors in all outbreak situation of antibiotic-associated diarrhea[J]. **Journal of Medical Microbiology**,2005,52(2):149-153.

[2] TAN Shaoping. Study on the treatment of infant diarrhea[J]. **International Medicine & Health Guidance News**,2006,12(24):

106.(in Chinese)
[3] 胡亚美. 诸福棠实用儿科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:1286-1287.
[4] ZHAO Guochang,ZHU Qizhui. Efforts to improve the level of diagnosis and treatment of infantile diarrhea[J]. **Journal of New Medicine**,2003,34(1):6.(in Chinese)
[5] DAMTONGMANEE A,UKARRAPOL N. Incidence of antibiotic-associated diarrhea in a pediatric am-bulatory care setting[J]. **Journal of the Medical Association of Thailand**,2007,90(3):513-517.
[6] USPENSKII IuP,ZAKHARENKO S M,FOMINYKH IuA. Perspective applications of multi-species probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhea[J]. **Experimental & Clinical Gastroenterology**,2013(2):54-64.
[7] THOMAS C,STEVENSON M,RILEY T V. Antibiotics and hospital-acquired Clostridium difficile-associated diarrhea:a systematic review[J]. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**,2003,51(6):1339-1350.
[8] DENG Hongjie,WU Hai,PENG Xiaoshan,et al. Effects of ultra-micro powder of qiweibaizhu on dysbacteriosis in mice with diarrhea[J]. **Progress in Modern Biomedicine**,2011,11(19):3632-3635.(in Chinese)
[9] XIAO Xinyun,ZHAO Xianping,TANG Biao,et al. The effect of Qi-Wei-Bai-Zhu-San on blood of diarrheal mice with dysbacteriosis[J]. **Microbiology**,2015,42(2):325-331.(in Chinese)
[10] 郭抗萧. 超微七味白术散与酵母菌配伍治疗菌群失调腹泻的研究[D]. 长沙:湖南中医药大学,2014:5-20.
[11] TAN Zhoujin,WU Hai,LIU Fulin,et al. Effect of ultra-micro powder qiweibaishusan on the intestinal microbiota and enzyme activities in mice[J]. **Acta Ecologica Sinica**,2012,32(21):6856-6863.(in Chinese)
[12] ZHANG Hualing,CAI Ying,Tan Zhoujin,et al. Effects of ultra-micro powder Qiweibaizhusan on metabolism diversity of intestinal microflora in diarrhea mice with dysbacteriosis[J]. **Chinese Journal of Applied and Environmental Biology**,2014,20(1):93-100.(in Chinese)
[13] WANG Ximiao,LI Huo,HE Miiaoyin,et al. Research progress of sweetener development[J]. **Guangdong Trace Elements Science**,2012,19(5):27.(in Chinese)
[14] BAO Mingwei. Introducton of Sweetener[J]. **Journal of Wuxi Education College**,2000,20(2):68-70.(in Chinese)
[15] PENG Hong. Imperative for Chinese traditional medicine preparation to replace sucrose with stevioside[J]. **Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine**,1995,11(3):36.(in Chinese)
[16] GAO F,YI Z Z,GONG J,et al. Molecular phylogeny and species separation of five morphologically similar Holosticha-complex ciliates(Protozoa,Ciliophora) using ARDRA riboprinting and multigene sequence data[J]. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**,2010,28(3):542-548.
[17] YANG Haijun. Promising sweetener-fructose syrup[J]. **Fajiao Keji Tongxun**,2006,35(4):32.(in Chinese)
[18] HUSE S M,DETHLEFSEN L,HUBER J A,et a1. Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing[J]. **PLoS Genetics**,2008,4(11):e1000255.
[19] 吴海. 超微七味白术散对肠道微生物分子多样性的影响[D]. 长沙:湖南中医药大学,2012:1-18.
[20] ZENG Ao,ZHANG Hualing,TAN Zhoujin,et al. The construction of mice diarrhea model due to dysbacteriosis and curative effect of ultra-micro Qiweibaizhusan[J]. **Microbiology**,2012,39(9):1341-1348.(in Chinese)
[21] ECKBURG P B,BIK E M,BERNSTEIN C N,et al. Diversity of the human intestinal microbial flora[J]. **Science**,2005,308:1635-1638.
[22] WU Hai,ZHOU Sainan,GUO Chun,et al. A metagenome DNA extracting method of intestinal flora in mice for molecular diversity analysis based on PCR technology[J]. **Chinese Journal of Microecology**,2012,24(7):648-651.(in Chinese)
[23] KUROKAWA K,ITOH T,KUWAHARA T,et al. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiome[J]. **DNA Research**,2007,14(4):169-181.
[24] WANG Yuan,YU Liangke,HAN Xiuhong,et al. Observation of seven kinds of powder curative effect in the treatment of antibiotic associated diarrhea[J]. **Lishizhen Medicine and Materia Medica Research**,2013,24(10):2451-2452.(in Chinese)
[25] JIANG Jie,GUO Kangxiao,LONG Ling,et al. Inhibiting effect of ultra-micro powder Qiweibaizhusan on bacteria in vitro[J]. **Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine**,2013,20(11):28-30.(in Chinese)