

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.25.007

3 种方法治疗肠道菌群失调合并过敏性哮喘大鼠对肠道菌群的影响*

付 雯,刘兴隆,张珑琼,高永翔[△]

(成都中医药大学 610075)

[摘要] 目的 根据“肺与大肠相表里”的理论,为肺肠合治法治疗肠道菌群失调并过敏性哮喘提供理论依据。方法 实验共分了空白组、模型组、阳性组和 3 种中药复方的给药组;采用头孢哌酮加白色念珠菌灌胃 SD 大鼠的方式复制肠道菌群失调,并在此基础上运用卵清蛋白注射致敏与雾化诱发哮喘,雾化同时分别给予加味升降散、桂枝加厚朴杏子汤和增液承气汤药液从肺肠合治、治肺和治肠进行治疗;采用 Buxco 全身体积描记系统分析呼吸功能,通过 16SrDNA 分析肠道菌群的变化。结果 根据 OTU 值分析各组肠道菌群物种组成发现,各组对乳酸杆菌的恢复接近空白组且优于阳性组,3 个治疗组均可促进变形菌门和拟杆菌门菌群的恢复,但肺肠合治效果最佳,通过 Alpha 多样性分析发现肠道微生物菌群多样性从高到低分别是治肠组、治肺组、肺肠合治组、模型组;呼吸频率和气道高反应性模型组为 260.56(1.28),治疗后肺肠合治组、治肺组和治肠组分别为 141.79(0.93)、137.25(1.30)和 203.16(0.84),各治疗组大鼠呼吸频率均低于模型组,而气道高反应性只有肺肠合治组和治肠组低于模型组且差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 肺肠合治法治疗肠道菌群失调合并过敏性哮喘大鼠在肺功能和肠道菌群恢复上优于单纯治肠或治肺法。

[关键词] 哮喘;肠道菌群;中医治疗学**[中图法分类号]** R256.12**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)25-3477-03

Influence of three different therapeutic methods on intestinal flora in treating rat intestinal dysbacteriosis complicating allergic asthma*

Fu Wen, Liu Xinlong, Zhang Longqiong, Gao Yongxiang[△]

(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan 610075, China)

[Abstract] **Objective** To provide a theoretical basis for the pulmonary enteric therapy in treating intestinal dysbacteriosis complicating allergic asthma according to the traditional theory of "Lung and Large intestine are interiorly-exteriorly". **Methods** The experiment included the blank group, model group, positive control group and three kinds of traditional Chinese medicine compound administration group; the intestinal dysbacteriosis in SD rats was duplicated by adopting cefoperazone and candida albicans gavage. On this basis ovalbumin injection sensitization and nebulization were applied to induce asthma. Meanwhile Jia-Wei-Sheng-Jiang Powder(SJS), Guizhi-Jia-Houpu-Xingzi Decoction(GHX) and Zeng-Ye-Cheng-Qi Decoction(ZYCQ) were orally administered for treatment of lung-intestine combine therapy, lung therapy and intestine therapy. The respiratory function was analyzed by using the Buxco whole body plethysmography. The variety of intestinal flora were analyzed by using 16SrDNA. **Results** Analyzing the species composition of intestinal flora in each group by the OUT value found that the recovery of Lactobacillus in each group was close to that in the blank group and better than that in the positive group, meanwhile, 3 treatment groups all could promote the recovery of Proteobacteria and bacteroidetes, but the lung-intestine combine therapy had optimal effect, the Alpha diversity analysis found that the intestinal microflora diversities from high to low were in turn the intestinal therapy group, lung therapy group, lung-intestine combined therapy group and model group; the respiratory frequency and airway hyperreactivity in the model group was 260.56(1.28), which in the lung-intestine combined therapy group, lung therapy and intestine therapy after treatment were 141.79(0.93), 137.25(1.30) and 203.16(0.84) respectively, the rat respiratory frequency in each treatment group was lower than that in the model group, while the airway hyperreactivity only in the lung-intestine combined therapy group and intestine therapy group was lower than that in the model group, moreover showing statistical significance. **Conclusion** The lung-intestine combine therapy method for treating rat intestinal dysbacteriosis complicating allergic asthma is superior to simple lung therapy method or intestine therapy method.

[Key words] asthma; intestinal microflora; therapeutics

过敏性哮喘(allergic asthma)是由多种细胞特别是肥大细胞、嗜酸性粒细胞和 T 淋巴细胞参与的慢性气道炎症^[1]。大量研究表明哮喘患者的肠道菌群多样性均发生变化,提示过敏性哮喘与肠道菌群的多样性关系密切^[2-3];临床研究也发现,在利用常规手段治疗过敏性哮喘患者同时调节患者的肠道菌群,恢复肠道微生态,可提高过敏性哮喘的治疗效果,而且复发率更低^[4]。中医认为:“肺与大肠相表里,肺病及肠,肠病亦可及肺”^[5]。现代医学研究也表明肺与肠关系密切,并且二者均参

与了公共黏膜免疫系统的构成。因此,本研究基于“肺与大肠相表里”的理论,笔者提出在治法上分别从肺肠合治、治肺、治肠治疗肠道菌群失调合并过敏性哮喘大鼠,研究 3 种治法对模型大鼠肠道菌群和呼吸功能的影响,为中医治疗肠道菌群失调合并过敏性哮喘提供实验依据。

1 材料与方

1.1 实验动物 SPF 级 SD 大鼠 50 只,雄性,体质量(200±20)g,购于简阳达硕动物科技有限公司,许可证号:SCXK(M)

2008-15(川)。SD 大鼠饲养于标准大鼠塑料笼中,动物自由进食及饮用生活饮用水。动物房温度 20~24℃,相对湿度 40%~70%,空气流通。

1.2 仪器与试剂 头孢哌酮(华北制药河北华民药业有限责任公司,批号 PC5130301);枯草芽孢杆菌二联活菌(后简称妈咪爱,北京韩美药品有限公司,批号 20131250);氨茶碱(西南药业股份有限公司,批号 20140302);QIAamp DNA Stool Mini Kit(Qiagen,批号 145050844);白色念珠菌(广东环凯微生物科技有限公司,批号 A0081B);ELISA Kit for sIgA(上海一研生物科技有限公司,批号 LOT201411)。

1.3 各组处理方案及模型构建方法

1.3.1 空白组 适应性喂养结束后,以无菌水代替生活饮用水,生理盐水代替卵清蛋白(OVA)进行灌胃、注射致敏和雾化吸入。

1.3.2 模型组 适应性喂养结束后,给予 SD 大鼠 0.5 g/L 的头孢哌酮水溶液,自由饮用,连续处理 5 d。第 6 天将生活饮用水换成无菌水,同时单次灌胃 10^9 cfu/mL 的白色念珠菌 50 μ L,使其定植肠道,以进一步加重肠道菌群失调。将配制好的 OVA 凝胶致敏剂,分别于第 0 天和第 7 天于大鼠双侧胸部和腹部共 4 点皮下注射各 0.15 mL,同时腹腔注射 0.40 mL,共 1.00 mL。第 14 天开始将大鼠置于 10 cm×10 cm×20 cm 有机玻璃盒内,超声雾化吸入 1% OVA 以诱发哮喘,每天 1 次,每次 30 min,连续 7 d。

1.3.3 阳性组 造模后从激发当天开始以妈咪爱+氨茶碱灌胃,连续 7 d。

1.3.4 给药组 造模后,从激发当天开始 3 种方药根据成人每日中药的服用量,依据《药理实验方法学》人和鼠之间体积比换算系数进行换算,以换算后的剂量灌胃大鼠,连续 7 d。各组药物具体灌胃方案见表 1(人体质量按 60 kg 计算)。

表 1 各组处理方案

组别	生理盐水 (mL/200 g)	妈咪爱 (mL/200 g)	氨茶碱 (mg/200 g)	中药浓缩液 (mL/200 g)
空白组	1	—	—	—
模型组	1	—	—	—
阳性组	—	1	62.5	—
肺肠合治组	—	—	—	1.50
治肠组	—	—	—	1.92
治肺组	—	—	—	0.75

1.4 药物制备及给药方法

1.4.1 桂枝加厚朴杏子汤 治肠组采用桂枝加厚朴杏子汤,桂枝 9 g,炙厚朴 6 g,杏仁 6 g,白芍 9 g,炙甘草 6 g,生姜 9 g,大枣 3 枚。

1.4.2 增液承气汤 治肺组采用增液承气汤,玄参 30 g,麦冬(连心)24 g,细生地 24 g,大黄 9 g,芒硝 4.5 g。

1.4.3 加味升降散 肺肠合治组采用加味升降散,炒僵蚕 10 g,蝉衣 6 g,姜黄 10 g,酒大黄 10 g,炙麻黄 6 g,苦杏仁 10 g,黄芩 10 g,厚朴 10 g。以上药物均购于成都市北京同仁堂药房,经成都中医药大学药学院李敏教授鉴定为正品,熬制成每 1 mL 药液含生药 1 g 的浓缩液,高温灭菌后冷藏备用。

1.5 大鼠肠道 16SrDNA 的检测 根据实验分组,每组均取 6 只动物,根据 QIAamp DNA Stool Handbook 操作说明提取粪便 DNA,每个样本 DNA 各取 20 μ L 混合均匀。将提取的基因

组 DNA 送深圳华大基因科技服务有限公司,分析 3 个样本的肠道菌群的物种基因组成。

1.6 大鼠呼吸功能测定 利用 Buxco 动物肺功能分析系统进行测定。

1.7 肺组织标本的病理切片分析 处死大鼠,迅速沿正中线打开胸腔,取下右肺下叶,固定好肺组织并用石蜡进行包埋。最后进行常规苏木精-伊红(HE)染色处理。

1.8 支气管肺泡灌洗液(BALF)、肠黏膜 sIgA 的检测 提取 BALF 和肠黏膜黏液,用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 sIgA 水平。

1.9 统计学处理 利用 SPSS13.0 软件对所有数据进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

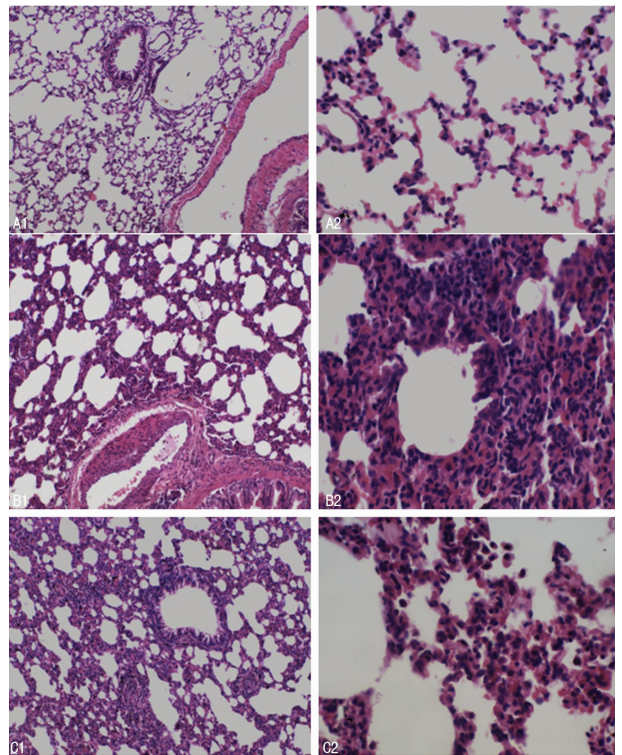
2.1 大鼠呼吸功能测定 模型组大鼠的呼吸频率显著高于空白组和阳性组($P < 0.01$);但对于气道高反应性指标而言,3 组差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

表 2 大鼠呼吸频率和气道高反应性比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	呼吸频率	气道高反应性
空白组	119.07±19.41	0.95±0.21
模型组	260.56±36.94**▲▲	1.28±0.09
阳性组	153.05±14.65*	1.07±0.11

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$,与空白组比较;▲▲: $P < 0.01$,与阳性组比较

2.2 BALF 细胞的 EOS 计数 模型组 BALF 中的嗜酸性粒细胞(3.36 ± 0.43)显著高于空白组(1.66 ± 0.33)和阳性组(1.0 ± 0),差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 3。



A:空白组;B:模型组;C:阳性组;编号 1 代表放大倍数 100 倍,编号 2 代表放大倍数 400 倍

图 1 肺组织 HE 染色观察

2.3 肺组织 HE 染色观察 空白组大鼠(图 1A)的肺组织未见明显炎性细胞;模型组(图 1B)肺组织中可见明显的炎性细

胞浸润,同时气管壁增厚伴气管腔缩小。阳性组大鼠的肺组织(图 1C)炎性细胞明显少于模型组,但比空白组仍有较多炎性细胞,气管管壁增厚的状态有所缓解。

2.4 BALF 和肠黏膜的 sIgA 水平 模型组 BALF 中的 sIgA 水平显著低于空白组($P < 0.05$);同时肠黏膜中 sIgA 的水平模型组显著低于空白组、阳性组($P < 0.01, P < 0.05$),见表 3。

表 3 BALF 和肠黏膜中 sIgA 的水平 ($n=8$)

组别	BALF	肠黏膜
空白组	0.50±0.04	0.34±0.05
模型组	0.43±0.07*	0.23±0.04**▲
阳性组	0.47±0.03	0.30±0.08

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$,与空白组比较,▲: $P < 0.05$,与阳性组比较

2.5 大鼠肠道 16SrDNA 的分析

2.5.1 OTU 及其丰度分析 各处理组内的物种丰度可通过 OTU 初步反映。模型组肠道菌群的物种丰度分别比治肠组和治肺组低 10.82% 和 13.6%,但高于肺肠合治组。

2.5.2 物种及其丰度分析 将不同样品的物种根据 OTU 值,按照门、纲、目、科、属进行分类,并跟数据库的数据进行比较,做出各样品物种 profiling 的柱状图。模型组的肠道乳酸杆菌比治肠组、治肺组和肺肠合治组分别低 86.88%、77.2% 和 74.69%,而且 3 个治疗组跟阳性组相比,分别高了 82.7%、82.6% 和 80.72%;模型组的变形菌门数量比治肠组、治肺组和肺肠合治组分别低 13.4%、29.69% 和 80.4%,见图 2。

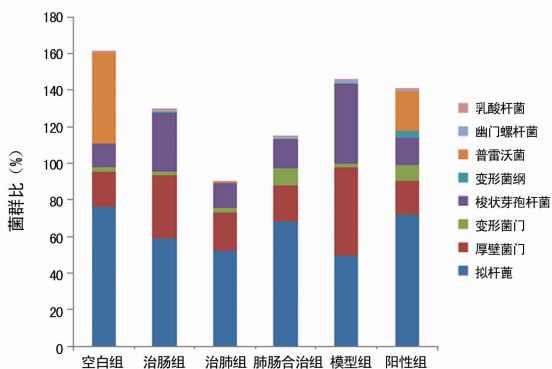


图 2 各处理组在各分类等级上的物种 profiling 柱状图

2.5.3 样品复杂度分析 (1)单个样品复杂性分析:模型组物种多样性最低,各治疗组的物种多样性从高到低分别是治肠组、治肺组、肺肠合治组,见表 4。(2)不同样品物种组成聚类分析:在物种组成相似性上,肺肠合治组、治肺组和模型组最接近,阳性组和治肠组则跟模型组距离稍远,空白组距离其他 5 组均较远。

2.6 大鼠呼吸功能测定 呼吸频率空白组为 (119.07±19.41)次,模型组 (260.56±36.94)次,阳性组 (153.05±14.65)次,肺肠合治组 (141.79±28.88)次,治肺组 (137.25±26.37)次,治肠组 (203.16±17.52)次。各治疗组大鼠呼吸频率均显著低于模型组($P < 0.01$),而且治肺组与肺肠合治组跟空白组的差异无统计学意义($P > 0.05$)。气道高反应性空白组 0.95±0.21,模型组 1.28±0.09,阳性组 1.07±0.11,肺肠合治组 0.93±0.12,治肺组 1.3±0.44,治肠组 0.84±0.16,肺肠合治组和治肠组均低于模型组且差异有统计学意义($P <$

0.05),其他各组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 4 样品 Alpha 多样性统计结果

组别	observed species 指数	chao 指数	ace 指数	shannon 指数	simpson 指数
空白组	828	2421.598	4178.229	3.794 849	0.062 506
模型组	593	1345.685	1980.971	3.003 873	0.124 486
阳性对照组	718	1560.595	2567.805	3.366 168	0.100 867
肺肠合治组	540	1105.366	1861.394	2.869 791	0.159 704
治肠组	731	1910.942	3193.557	3.731 453	0.062 812
治肺组	688	1587.905	2546.143	3.140 52	0.130 076

observed species、chao、ace 指数:反映样品中群落的丰富度;shannon、simpson 指数:反映群落的多样性

3 讨论

本实验分别从肺肠合治、治肺和治肠三个角度利用加味升降散、桂枝加厚朴杏子汤、增液承气汤治疗肠道菌群失调合并过敏性哮喘大鼠。选方依据:桂枝加厚朴杏子汤首载于《伤寒论·辨太阳病脉证并治》第 18 条“喘家作,桂枝汤,加厚朴、杏子佳”与第 43 条“太阳病,下之,微喘者,表未解故也,桂枝加厚朴杏子汤主之。”此方是中医“伤寒论”中治疗哮喘病症的经典方之一,同时已有许多研究表明此方可以治疗哮喘。廖伟平^[6]利用加减该方的方法治疗变异型哮喘患者 35 例,试验结果表明治疗组显效率 88.6%,对照组(常规西药)显效率 53.3%;而 1 年后复发率治疗组为 14.3%,对照组为 40.0%,可见该方治疗效果显著优于对照组,因此作为从肺治疗的方药;《温病条辨·中焦篇》第 17 条指出:“阳明温病,下之不通,其证有五……津液不足,无水舟停者,间服增液,再不下者,增液承气汤主之。”增液承气汤具有滋阴增液,泄热通便的功效。肖阳娥等^[7]利用该方治疗 40 例慢性呼吸衰竭患者发现,中医治疗组有效率达到 82.5%,而对照组仅 56.6%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。王爱华^[8]利用该方治疗哮喘证患者,发现患者服用 10 剂后即康复。根据“肺与大肠相表里”理论,增液承气汤可以承气清热、增液益津,从而达到化痰降气平喘的功效,因此作为从肠治肺的方药;升降散源于明代医家张鹤腾编著的《伤暑全书》,后得清代医家杨栗山发挥载于《伤寒瘟疫条辨》^[9]。该方以僵蚕为君,蝉蜕为臣,姜黄为佐,大黄为使,米酒为引,蜂蜜为导。鲁恒心^[10]研究发现利用升降散加减治疗咳嗽变异型哮喘 38 例,有效率高达 92.11%;靳文学等^[11]利用加味升降散治疗过敏性哮喘豚鼠,结果表明加味升降散可下调哮喘豚鼠肺内 sIgA 的高免疫状态。笔者在主办方基础上,加了炙麻黄、苦杏仁、黄芩和厚朴。麻黄和杏仁加强了该方的升降作用;黄芩清肺解毒,泄肺之郁热;厚朴下气平喘,通畅腑气,作为肺肠合治的方药。

本实验结果显示,所有治疗组肠道菌群中正常菌群的数量均有不同程度的提高,有害菌群数量降低,但是对于肠道微生物菌群多样性的恢复,治肠组优于其他两组。但肺肠合治组对变形菌门和拟杆菌门的恢复效果最佳,说明肺肠合治法对于肠道优势菌种的恢复比单纯治肠法更有优势。升降散的应用目前国内主要集中在呼吸道疾病或外感发热等疾病上^[12-13]。本实验发现该方对肠道菌群的恢复具有疗效,还可应用于肠道疾病的治疗。

对于改善过敏性哮喘的典型症状呼吸频率和呼吸道高反应性而言,3 组均能有效地降低呼吸频率,但只有肺肠合治组对呼吸道高反应性也有比较好的改善作用,说明(下转第 3483 页)

- tophagy activation in proximal tubular epithelial cells in diabetic nephropathy[J]. *J Diabetes Complications*, 2015, 29(8):976-983.
- [8] Preisig PA, Franch HA. Renal epithelial cell hyperplasia and hypertrophy[J]. *Semin Nephrol*, 1995, 15(4):327-340.
- [9] Shankland SJ, Wolf G. Cell cycle regulatory proteins in renal disease: role in hypertrophy, proliferation, and apoptosis[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000, 278(4):F515-F529.
- [10] Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy[J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(7):713-720.
- [11] Wang ZB, Choi ME. Autophagy in kidney health and disease[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(3):519-537.
- [12] Barbosa JA, Zhou H, Hultenschmidt D, et al. Inhibition of cellular autophagy in proximal tubular cells of the kidney in streptozotocin-diabetic and uninephrectomized rats[J]. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 1992, 61(6):359-366.
- [13] Kitada M, Takeda A, Nagai T, et al. Dietary restriction ameliorates diabetic nephropathy through Anti-Inflammatory effects and regulation of the autophagy via restoration of Sirt1 in diabetic wistar fatty (fa/fa) rats: a model of type 2 diabetes[J]. *Exp Diabetes Res*, 2011:908185.
- [14] Liu WJ, Luo MN, Tan J, et al. Autophagy activation re-
- duces renal tubular injury induced by urinary proteins [J]. *Autophagy*, 2014, 10(2):243-256.
- [15] Liu WJ, Shen TT, Chen RH, et al. Autophagy-Lysosome pathway in renal tubular epithelial cells is disrupted by advanced glycation end products in diabetic nephropathy [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(33):20499-20510.
- [16] Nolin AC, Mulhern RM, Panchenko MV, et al. Proteinuria causes dysfunctional autophagy in the proximal tubule [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2016, 311(6):F1271-F1279.
- [17] Sui XB, Kong N, Ye L, et al. p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents [J]. *Cancer Lett*, 2014, 344(2):174-179.
- [18] Paillas S, Causse A, Marzi L, et al. MAPK14/p38 alpha confers irinotecan resistance to TP53-defective cells by inducing survival autophagy[J]. *Autophagy*, 2012, 8(7):1098-1112.
- [19] Cruz-Morcillo LA, Valero ML, Callejas-Valera JL, et al. P38MAPK is a major determinant of the balance between apoptosis and autophagy triggered by 5-fluorouracil: implication in resistance [J]. *Oncogene*, 2012, 31(9):1073-1085.

(收稿日期:2016-12-15 修回日期:2017-06-09)

(上接第 3479 页)

肺肠合治法在对过敏性哮喘呼吸功能的恢复上优于单纯治肺法和单纯治肠法。这与国内其他学者利用肺肠合治法治疗过敏性哮喘的实验结果一致^[14]。

综上所述,肺肠合治的治疗方法对于治疗肠道菌群失调合并过敏性哮喘大鼠在肺功能和肠道菌群恢复上都具有明显的优势和疗效,可作为治疗该病的首选治疗方案,为中医治疗肠道菌群失调合并过敏性哮喘提供了实验依据。治肠方在肠道菌群多样性的恢复上具有明显优势,而且治肺组对肠道致病菌梭状芽孢杆菌的抑制作用最优,因此可通过重新配伍的方法找到一个更优的肺肠合治方。

参考文献

- [1] 刘子雯,申卫红. Th17 细胞在过敏性哮喘患者中的临床研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2016, 37(7):995-997.
- [2] 张琳. 肠道微生态环境与儿童过敏性疾病的关系以及参芪健脾方对肠黏膜屏障功能修复和免疫功能调整的研究[D]. 石家庄:河北中医药大学, 2011:2-3.
- [3] 李春燕. 支气管哮喘患者肠道菌群多样性变化[J]. *科技导报*, 2013, 30(30):63-67.
- [4] 马红玲,王和平,祖莹,等. 双歧杆菌对过敏性哮喘儿童 DC 成熟及其分泌细胞因子的影响[J]. *中国实验诊断学*, 2011, 15(8):1311-1315.
- [5] 张芸,史锁芳. “肺与大肠相表里”学说的现代研究进展

[J]. *中医研究*, 2015, 28(5):73-75.

- [6] 廖伟平. 桂枝加厚朴杏子汤加减治疗变异型哮喘 35 例 [J]. *内蒙古中医药*, 2012, 31(3):17.
- [7] 肖阳娥,黄晓川. 增液承气汤加减救治 40 例[J]. *新中医*, 1997, 29(3):18-19.
- [8] 王爱华. 增液承气汤治喘 1 例报道[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2008, 11(10):139.
- [9] 郭来,郭天然. 升降散临床应用新进展[J]. *中国中医急诊*, 2011, 20(1):112-113.
- [10] 鲁恒心. 升降散加减治疗咳嗽变异哮喘 38 例[J]. *中医中药*, 2013, 11(20):290-290.
- [11] 靳文学,白亚辉,杨宇. 加味升降散对过敏性哮喘豚鼠黏膜 sIgA 免疫影响的实验研究[J]. *中国中医急诊*, 2007, 16(4):447-448.
- [12] 黄汉超,陈宇,赵海方. 加味升降散对病毒感染后小鼠呼吸道上皮 VR1 表达及肺内 P 物质含量的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2016, 25(1):15-17.
- [13] 冯学武,朱宝,宋瑞平. 升降散加减治疗外感发热的体会 [J]. *中国中医急诊*, 2016, 25(1):182-183.
- [14] 钟大玲,吴佳佳. 大承气汤对过敏性哮喘小鼠肺组织形态及 IgE 水平的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2016, 23(7):58-60.

(收稿日期:2016-12-22 修回日期:2017-07-10)