

# 玉屏风散加味方对慢性阻塞性肺疾病大鼠 气道 3 种细菌的影响

彭静, 陈静, 田守征, 邢海晶, 袁嘉丽\*  
(云南中医学院, 昆明 650500)

**[摘要]** **目的:**观察不同剂量玉屏风散加味方对慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠气道流感嗜血杆菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌的影响,为玉屏风散加味方治疗 COPD 提供一定的实验依据。**方法:**Wistar 大鼠通过气管滴注脂多糖(LPS)加烟熏的方法建立 COPD 大鼠模型,模型成功的大鼠随机分为模型组、玉屏风散加味方高、中、低剂量组(4.644,9.288,27.864 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),另设正常组,每组 10 只。利用高通量测序分析每组 3 种细菌的含量,苏木素-伊红(HE)观察右肺组织病理学变化。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠气道流感嗜血杆菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌含量明显升高( $P < 0.05$ ),右肺组织病理学观察显示模型组大鼠右肺组织慢性炎症细胞增多和少量中性粒细胞浸润;与模型组比较,玉屏风散加味方低、中剂量组的流感嗜血杆菌含量均明显降低( $P < 0.05$ ),玉屏风散加味方高、中、低剂量组的肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌含量明显降低( $P < 0.05, P < 0.01$ ),大鼠右肺组织病变明显减轻。**结论:**玉屏风散加味方对 COPD 大鼠气道流感嗜血杆菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌含量有明显的降低作用,低剂量组对铜绿假单胞菌的作用更为明显,这可能是其治疗 COPD 的重要机制之一。

**[关键词]** 玉屏风散加味方;慢性阻塞性肺疾病;流感嗜血杆菌;肺炎克雷伯菌;铜绿假单胞菌

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)18-0123-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016180123

## Effect of Modified Yupingfeng San on Three Kinds of Bacteria in Airway of COPD Rats

PENG Jing, CHEN Jing, TIAN Shou-zheng, XING Hai-jing, YUAN Jia-li\*  
(Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effects of different doses of modified Yupingfeng San on *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* in airway of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) rats, and provide experimental basis for the treatment of COPD by modified Yupingfeng San. **Method:** COPD rat models were induced by intratracheal instillation of LPS plus smoked method. The Wistar rats were randomly divided into normal group, model group, modified Yupingfeng San high dose, middle dose and low dose groups (4.644, 9.288, 27.864 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),  $n = 10$  in each group. The contents of 3 kinds of bacteria were analyzed by high-throughput sequencing method in each group, and the histopathological changes of the right lung were observed by HE staining. **Result:** As compared with the normal group, the contents of *H. influenzae*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* were increased in the airway of model group mice ( $P < 0.05$ ); right lung pathological observation results showed increase of chronic inflammatory cells in right lungs of model group and a small amount of neutrophil infiltration. As compared with the model group, the contents of *H. influenzae*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* were decreased in modified Yupingfeng San low dose and middle dose groups ( $P < 0.05$ ); the contents of the above bacteria were decreased in modified Yupingfeng San low

**[收稿日期]** 20151022(004)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81460684)

**[第一作者]** 彭静, 硕士, 从事微生物学科研与教学工作, Tel:15887055298, E-mail: pengjing169@126.com

**[通讯作者]** \*袁嘉丽, 博士, 教授, 从事中西医结合呼吸道感染机制与微生态平衡相关性研究, Tel:0871-65919932, E-mail: yjl6688767@sina.com

dose, middle dose and high dose groups ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and the lesions in right lung tissues were significantly improved. **Conclusion:** Modified Yupingfeng San could significantly reduce the contents of *H. influenza*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* in airway of COPD rats, and the low dose group had more obvious effects on *P. aeruginosa*. This may be one of the important mechanisms for the treatment of COPD.

[**Key words**] modified Yupingfeng San; chronic obstructive pulmonary disease; *Haemophilus influenzae*; *Klebsiella pneumoniae*; *Pseudomonas aeruginosa*

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种气流受限、进行性发展的肺系慢性疾病<sup>[1]</sup>。COPD 在中医属于“肺胀”的范畴,是多种慢性肺系疾病反复发作,迁延不愈,导致肺气胀满,不能敛降的一种病证<sup>[2]</sup>。目前,现代医学治疗 COPD 主要是停止吸烟、避免和防止粉尘、烟雾及有害气体吸入,同时给予控制性氧疗、抗感染、扩张支气管、糖皮质激素、机械通气等治疗。中医药在治疗 COPD 方面有着独特的疗效,且副作用较小。

益气固表之经典方剂玉屏风散出自元·朱丹溪的《丹溪心法》,为中药免疫调节剂。前期研究发现玉屏风散加味方可延缓 COPD 气道重塑病变<sup>[3]</sup>,后期选定玉屏风散加味方作为“益气涤痰逐瘀”治法之方药,从气道炎症角度观察其对 COPD 大鼠气道流感嗜血杆菌、肺炎克雷伯菌和铜绿假单胞菌的影响作用,分析其治疗 COPD 的可能机制,为进一步推广应用提供理论依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 雄性 SPF 级 Wistar 大鼠,体重 (250 ± 20) g,购于成都达硕生物科技有限公司,动物合格证号 SCXK(川)2013-0024,在云南中医学院实验动物中心饲养。

**1.2 药物及试剂** 玉屏风散加味方(黄芪、白术、防风、桑白皮、浙贝母、芥子、三七、莪术 8 味中药组成),由云南中医学院附属中医医院药房提供,由云南中医学院中药鉴定教研室左爱学教授鉴定其品种和质量。全方生药总质量 129 g,以成人每日治疗剂量根据大鼠体表面积换算为其等效剂量,此剂量作为中剂量组,在此基础上经过浓缩和稀释获得高、低剂量,低、中、高剂量的比例为 0.5:1:3。红河牌香烟(红河卷烟厂,烟碱含量 10 mg/支),脂多糖(LPS,美国 Sigma 公司,批号 L2880),细菌基因组 DNA 提取试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司,批号 SK8256),实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)试剂盒(美国 ABI 公司,批号 4472908)。

**1.3 仪器** ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪(美国

Applied Biosystem 公司),Flurochem 9900-50 型数字凝胶成像系统(美国 Alpha Innotech 公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组及模型制备**<sup>[4]</sup> 大鼠适应性饲养 1 周后随机分为 5 组,每组 10 只,分别为正常组、COPD 动物模型组、玉屏风散加味方高、中、低剂量组。除正常组外,其余 4 组分别于第 1,8,15,22 天向各实验组大鼠(10% 水合氯醛 ip)气管内注入脂多糖 200 μL,第 2~28 天(注射 LPS 当天除外)上午将大鼠置入自制密闭的有机玻璃箱内,注入 5% 红河牌香烟烟雾,30 min·d<sup>-1</sup>,共 28 d(4 周);第 5 周开始,隔日烟熏雾化 1 次,30 min·d<sup>-1</sup>,直至 16 周。正常组不予烟熏,但采用相同的方法气管内滴入等量的生理盐水。

**2.2 给药方法** 第 12 周起,每日造模后 4 h ig 给药,玉屏风散加味方中剂量组为 9.288 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,低、中、高剂量的比例为 0.5:1:3,每日给药 1 次,连续给药直至第 16 周实验结束。正常组和模型组以无菌蒸馏水 ig。

**2.3 指标检测** 于用药结束后的第 2 天快速处死大鼠后,将其置于大鼠手术台,无菌条件下剪开颈部皮肤,钝性分离,暴露出气管和双肺,结扎右主支气管,以生理盐水对大鼠左肺进行支气管肺泡灌洗,收集支气管肺泡灌洗液(BALF)做 3 种细菌的高通量测序检测,取其右肺组织制作病理切片。

**2.4 统计学方法** 采用 SPSS 17.0 统计学软件进行数据处理,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对 COPD 大鼠肺组织病理学的影响** 正常组大鼠支气管上皮完整,管腔内无明显渗出与炎性细胞浸润;模型组大鼠气道及各级支气管黏膜下可见不同程度的慢性炎症细胞(包括淋巴细胞、浆细胞及单核细胞)和少量中性粒细胞浸润;支气管平滑肌厚度明显增加、支气管纤毛柱状上皮部分脱落、纤毛粘连倒伏、变形坏死,气道上皮复层化,杯状上皮细胞增生;肺小动脉管壁增厚;部分肺泡扩张融合。

玉屏风散加味方高、中剂量组表现比模型组明显减轻,低剂量组改善不明显。见图 1。

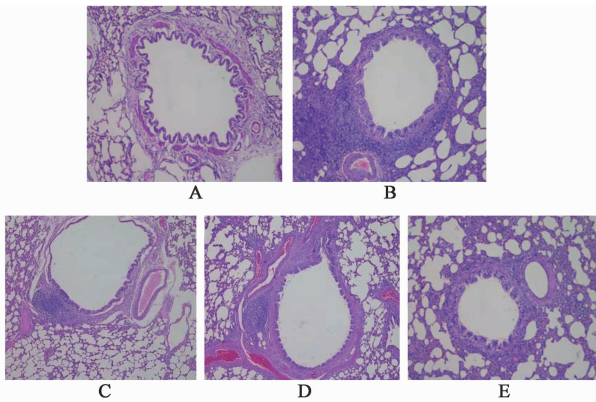


图 1 玉屏风散加味方对 COPD 大鼠肺组织病理学的影响 (HE,  $\times 100$ )  
A. 正常组; B. 模型组; C. 玉屏风散加味方 27.864  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  组; D. 玉屏风散加味方 9.288  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  组; E. 玉屏风散加味方 4.644  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  组

Fig. 1 Effects of modified Yupingfeng San on pulmonary pathology in COPD rats (HE,  $\times 100$ )

**3.2 对 COPD 大鼠肺组织流感嗜血杆菌含量的影响** 5 组大鼠在实验过程中由于操作不当等原因均有不同程度的死亡。与正常组比较,模型组大鼠肺组织流感嗜血杆菌含量明显升高 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,玉屏风散加味方低、中剂量组的流感嗜血杆菌含量均明显降低 ( $P < 0.05$ );玉屏风散加味方高剂量组与模型组比较,流感嗜血杆菌含量差异无统计学意义。见表 1。

表 1 玉屏风散加味方对 COPD 大鼠肺组织流感嗜血杆菌含量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effects of modified Yupingfeng San on *Haemophilus influenzae* content in lung tissue of COPD rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	n	流感嗜血杆菌/%
正常	-	8	0.174 $\pm$ 0.092 <sup>1)</sup>
模型	-	7	0.297 $\pm$ 0.115
玉屏风散加味方	4.644	9	0.169 $\pm$ 0.069 <sup>1)</sup>
	9.288	7	0.144 $\pm$ 0.075 <sup>1)</sup>
	27.864	7	0.211 $\pm$ 0.051

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ (表 2 同)。

**3.3 对 COPD 大鼠肺组织肺炎克雷伯菌含量的影响** 与正常组比较,模型组大鼠肺组织肺炎克雷伯菌含量明显升高 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,玉屏风散加味方高、中、低剂量组的肺炎克雷伯菌含量均显著降低 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

**3.4 对 COPD 大鼠肺组织铜绿假单胞菌含量的影响** 与正常组比较,模型组大鼠肺组织铜绿假单胞

表 2 玉屏风散加味方对 COPD 大鼠肺组织肺炎克雷伯菌含量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effects of modified Yupingfeng San on *Klebsiella pneumoniae* content in lung tissue of COPD rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	n	肺炎克雷伯菌/%
正常	-	8	0.551 $\pm$ 0.341 <sup>1)</sup>
模型	-	7	4.217 $\pm$ 3.623
玉屏风散加味方	4.644	9	1.264 $\pm$ 1.163 <sup>1)</sup>
	9.288	7	0.585 $\pm$ 0.419 <sup>1)</sup>
	27.864	7	1.079 $\pm$ 1.018 <sup>1)</sup>

菌含量明显升高 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,玉屏风散加味方高、中、低剂量组的铜绿假单胞菌含量显著降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),其中玉屏风散加味方低剂量组尤为明显 ( $P < 0.01$ )。见表 3。

表 3 玉屏风散加味方对 COPD 大鼠肺组织铜绿假单胞菌含量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Effects of modified Yupingfeng San on *Pseudomonas aeruginosa* content in lung tissue of COPD rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	n	铜绿假单胞菌/%
正常	-	8	0.375 $\pm$ 0.243 <sup>1)</sup>
模型	-	7	1.310 $\pm$ 0.890
玉屏风散加味方	4.644	9	0.349 $\pm$ 0.126 <sup>2)</sup>
	9.288	7	0.479 $\pm$ 0.266 <sup>1)</sup>
	27.864	7	0.390 $\pm$ 0.114 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

#### 4 讨论

众所周知,气道炎症、氧化与抗氧化失衡、蛋白酶与抗蛋白酶失衡是 COPD 重要的发病机制。多项研究表明,细菌感染是 COPD 发病和加剧的另一重要因素。下呼吸道细菌定植 (lower airway bacterial colonization, LABC) 常见于 COPD 稳定期患者,高达 50% 的稳定期 COPD 患者可检测到慢性细菌定植。下呼吸道潜在致病菌包括流感嗜血杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、肺炎链球菌、卡他莫拉菌等<sup>[5]</sup>。

流感嗜血杆菌属条件致病菌,主要寄生于上呼吸道,在机体抵抗力降低或局部微生态失调时,入侵机体引起感染。Dromann 等<sup>[6]</sup>的研究证实近 40% 的 COPD 患者肺组织内可检测到流感嗜血杆菌感染。肺炎克雷伯菌为革兰氏阴性兼性厌氧菌,有较厚的荚膜,该菌近年来成为仅次于大肠埃希菌的最重要的条件致病菌。其主要存在于人和动物肠道、呼吸道、泌尿道,当机体免疫力下降或长期使用大量抗生素导致菌群失调时可引起全身感染,最高的发

病率在呼吸道和尿道<sup>[7]</sup>。铜绿假单胞菌属非发酵革兰氏阴性杆菌,正常寄居在人体呼吸道内,是一种常见的条件致病菌。在正常状况下铜绿假单胞菌对人体并不致病,但是作为假单胞菌属中的代表菌种,铜绿假单胞菌是最重要的一种条件致病菌,也是下呼吸道感染的主要致病菌<sup>[8]</sup>。侯辰侠<sup>[9]</sup>研究发现,与健康人群比较,COPD 患者痰液中肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌的数量均显著增加。温庆辉等<sup>[10]</sup>研究了 316 例 COPD 急性加重期患者,有 212 例患者下呼吸道分泌物细菌培养阳性(67.1%),致病菌中铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌排在前列。

本实验结果显示,模型组大鼠气道流感嗜血杆菌、肺炎克雷伯菌和铜绿假单胞菌含量均显著升高,说明在 COPD 状态下确实存在 3 种细菌的定植,这可能引发并加重慢性气道炎症。而玉屏风散加味方能有效降低 COPD 大鼠气道 3 种细菌的含量,尤其是低剂量组对铜绿假单胞菌的作用更加明显,这减轻了 3 种细菌的定植程度,也减轻了慢性气道炎症的程度,可能是其治疗 COPD 的作用机制之一,为进一步推广应用提供了一定的理论依据。

[参考文献]

[1] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2011 年)[M]. 中华内科杂志,2002, 41(9):640-646.

[2] 吴勉华,王新月. 中医内科学[M]. 北京:中国中医药出版社,2012:128.

[3] 程羽,陈静,羊忠山,等. 玉屏风散加味方干预 COPD 气道重塑相关细胞因子作用研究[J]. 现代中西医结合杂志,2016,25(1):7-10.

[4] 杜飞,贺刚,周国旗,等. 灯盏花素对慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(7):192-194.

[5] 张昊,周新,张杏怡,等. 慢性阻塞性肺疾病稳定期下呼吸道细菌定植与肺功能关系研究[J]. 国际呼吸杂志,2008,28(17):1034-1037.

[6] Dromann D, Rupp J, Rohmann K. et al. The TGF-beta-pseudoreceptor BAMBI is strongly expressed in COPD lungs and regulated by nontypeable Haemophilus influenzae[J]. Respir Res,2010,11(1):67.

[7] 贾艳,孙长江,韩文瑜,等. 肺炎克雷伯菌研究进展[J]. 微生物学杂志,2006,26(5):75-78.

[8] 冯英,唐群力,刘宏伟. AECOPD 多耐药铜绿假单胞菌感染与营养状况相关分析[J]. 临床肺科杂志,2013,18(10):1904-1905.

[9] 侯辰侠. 慢性阻塞性肺病患者痰液菌群结构分析[D]. 大连:大连医科大学,2014.

[10] 温庆辉,高元妹,黎凤英,等. 下呼吸道分泌物细菌培养在慢性阻塞性肺疾病急性加重期的临床价值[J]. 重庆医学,2014,43(1):118-120.

[责任编辑 周冰冰]