

冬病夏治方穴位贴敷对哮喘豚鼠气道炎症及肠道菌群的影响

乡世健¹, 盛华芳², 吕亚梅², 安佰超¹, 吴文锋¹, 曹思玮¹, 阮世发¹, 王著显¹,
陈活记¹, 翁立冬¹, 朱红霞^{3*}, 刘强^{1*}

(1. 南方医科大学 中医药学院, 广州 510515; 2. 南方医科大学 珠江医院, 广州 510282;
3. 南方医科大学 中西医结合医院, 广州 510315)

[摘要] **目的:**探究冬病夏治方穴位贴敷给药对哮喘豚鼠的治疗作用及其对肠道菌群的影响。**方法:**将75只豚鼠随机分成空白组、哮喘模型组、阳性(地塞米松磷酸钠)组、穴位给药组、非穴位给药组($n=15$),采用卵蛋白注射及雾化吸入的方法建立豚鼠哮喘模型,通过肺组织病理苏木素-伊红(HE),马松(Masson)染色观察冬病夏治方对豚鼠哮喘的治疗效果。提取豚鼠粪便总基因组DNA,对16S rRNA V4可变区基因进行PCR扩增及Illumina HiSeq测序,将基因序列相似度高于97%的序列进行聚类归并,并进行生物信息学分析。**结果:**与哮喘模型组比较,各给药组豚鼠肺组织炎症细胞减少,支气管收缩、气道上皮增生症状改善明显,恢复良好,胶原纤维沉积均有不同程度减少,且地塞米松磷酸钠组与穴位给药组的减少程度明显,穴位给药组的治疗效果优于非穴位给药组。通过操作分类单元(OTU)及其丰度分析发现,冬病夏治方穴位贴敷给药后豚鼠的肠道菌群多样性升高,普氏菌属显著增多,拟杆菌门减少,变形菌增多;哮喘模型组厚壁菌数目较空白组及各给药组减少。**结论:**冬病夏治方穴位贴敷能有效治疗哮喘,改善哮喘症状,调控哮喘豚鼠肠道菌群的构成。提示该方可能通过调控肠道菌群从而影响机体免疫,达到治疗哮喘的效果,为研究哮喘的治疗机制提供一定的理论基础。

[关键词] 冬病夏治方; 穴位贴敷; 哮喘; 肠道菌群; 16S rRNA V4区; Illumina HiSeq 测序

[中图分类号] R22;R24;R285;R256.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)09-0095-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180833

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180125.1428.001.html>

[网络出版时间] 2018-01-26 8:59

Effect of Dongbing Xiazhi Fang on Airway Inflammation and Intestinal Flora in Guinea Pig Model of Asthma Through Acupoint Application

XIANG Shi-jian¹, SHENG Hua-fang², LYU Ya-mei², AN Bai-chao¹, WU Wen-feng¹,
CAO Si-wei¹, RUAN Shi-fa¹, WANG Zhu-xian¹, CHEN Huo-ji¹, WENG Li-dong¹,
ZHU Hong-xia^{3*}, LIU Qiang^{1*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine (TCM), Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;
2. Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China;
3. Integrated Hospital of TCM, Southern Medical University, Guangzhou 510315, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the efficacy of Dongbing Xiazhi Fang (DXF) on asthmatic guinea pigs through acupoint-application, and its effect on intestinal flora of asthmatic guinea pigs. **Method:** Seventy five guinea pigs were randomly divided into blank control group, asthmatic model group, positive control group, acupoint-application group and non-acupoint-application group ($n=15$). The asthmatic model of guinea pigs was established through ovalbumin injection and aerosol inhalation, except for the blank control group. The

[收稿日期] 20171022(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373975)

[第一作者] 乡世健,博士,从事中药药理学研究,Tel:020-62789408,E-mail: xiangshijian0614@126.com

[通信作者] *朱红霞,副主任医师,从事儿科临床研究,E-mail:gzzhx2012@163.com;

*刘强,博士,教授,从事中药药理学研究,E-mail:gzlq2002@163.com

hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining pathologic sections of lung tissue in asthma were observed. The total genomic DNA was extracted from guinea pig feces, and the 16 S rRNA V4 variable region gene was amplified by PCR and sequenced by Illumina HiSeq. The gene sequences with the similarity of more than 97% were clustered, and analyzed by bioinformatics. **Result:** Compared with the asthmatic model group, the other groups of guinea pigs showed reduced inflammatory cells, bronchoconstriction, and alleviated airway epithelial hyperplasia and good recovery and various degrees of reduced collagen fiber deposition. The positive group and the acupoint-application group showed a more obvious degree of reduction, and the therapeutic effect of the acupoint-application group was better than that of the non-acupoint-application group. The analysis of operational taxonomic unit (OTU) and its abundance indicated that the proportion of various bacteria changed after the onset of asthma. The diversity of intestinal flora of guinea pigs significantly increased after being treated with DXF and *Prevotella*. The proportion of Bacteroides in the positive control group and other administration groups were less than that in the asthmatic model group, while the proportion of Proteobacteria and Firmicutes were more than that in the asthmatic model group. **Conclusion:** DXF has an effect in treating asthma through transdermal acupoint-application, and can alleviate asthma symptoms, regulate the composition of intestinal flora in asthmatic guinea pigs. The results suggest that the prescription have the efficacy on asthma by affecting the body immunity and regulating the intestinal flora, and provide a theoretical basis for studying the treatment mechanism of asthma.

[**Key words**] Dongbing Xiazhi Fang; acupoint application; asthma; intestinal flora; 16 S rRNA V4 variable region; Illumina HiSeq sequencing

哮喘是一种支气管慢性炎症性疾病,是全球最常见的慢性疾病之一,全球范围内约 3 亿人口受其困扰^[1],其日益增长的发病率与死亡率受到了广泛的关注^[2]。哮喘的主要特征为气道炎症、气道高反应性可逆性气道阻塞、黏液水肿、黏液分泌过多和气道重塑导致的气喘发作、咳嗽、气短等^[3,4],主要与免疫紊乱有关。目前,吸入性糖皮质激素类药物为治疗哮喘、控制哮喘患者气道炎症的一线药物,然而在治疗的过程中,当此类药物用药剂量增加时,可导致言语障碍、鹅口疮、肾上腺抑制和骨质疏松症等副作用^[5],而且将近一半的哮喘患者在接受此类药物的治疗后效果不佳甚至无效^[3,6-7]。因此,寻找新的哮喘治疗手段及药物刻不容缓。冬病夏治方源于清朝名医张璐所著的《张氏医通》^[8],广泛应用于哮喘的预防与治疗,效果良好,顾红丹^[9]对 100 例哮喘儿童随机分为实验组与空白组进行对照试验,发现与仅采用吸入激素治疗比较,吸入激素治疗联合穴位贴敷冬病夏治方治疗后能显著的升高患儿白细胞介素-2(IL-2), γ -干扰素(IFN- γ)的表达水平,显著降低 IL-4,IL-5,IL-13 的表达水平,降低儿童哮喘的复发率。冬病夏治方可减轻哮喘症状,通过穴位贴敷对经络的刺激作用,调节机体免疫,促进哮喘患者机体免疫平衡和提高生活质量^[10],且副作用低,是一种理想的哮喘治疗方法。

人体胃肠道微生物包括的细菌、真菌和病毒数

量巨大,种类繁多,约 400 ~ 1 000 种,细菌数目约 1×10^{14} 个,为人体细胞总数的 10 倍,是一个庞大而复杂的微生态系统^[11]。乳酸杆菌和双歧杆菌是肠道菌群的正常组成部分之一,且在目前临床所使用的微生态制剂中作为最主要的成分,其可通过多种途径对免疫反应进行调控,从而调节 Th1/Th2 之间的平衡^[12]。肠道菌群可激发肠道树突状细胞明显的耐受性,介导 T 细胞分化,双歧杆菌能有效降低血清中 IL-4,抑制增强的 Th2 反应,纠正新生儿 Th 细胞向 Th2 分化的偏移^[13]。脆弱拟杆菌和梭状芽孢杆菌可刺激调节 T 细胞(Treg),其可产生 IL-10 及降低免疫球蛋白 IgE 的分泌^[14]。

肠道菌群对维持机体内环境问题具有重要作用^[15],近年来,肠道菌群在过敏性哮喘的发生、发展中所发挥的作用渐被关注。肠道内存在着人体中最大的淋巴组织,同时亦是人体内正常菌群储存最多的地方,二者相互作用,与哮喘等过敏性疾病的发生具有密切的关系^[12]。Sagar 等^[16]研究发现短双歧杆菌与非消化性寡糖的组合可抑制气道炎症及降低 T 细胞活化,且调节细胞因子和转录因子的表达,减少气道重塑。Harb 等^[17]研究发现补充鼠李糖乳杆菌 GG 株可改善哮喘小鼠气管过敏反应、膳食纤维及其发酵产物,如短链脂肪酸等能通过调节免疫功能来抑制过敏性气道炎症的发展。这类膳食所影响的肠道菌群及代谢,对哮喘产生有益作用^[18-19]。

因此,进一步说明肠道菌群与哮喘具有密切的关联。哮喘发病机制的核心为 Th1/Th2 失衡学说,即 Th1 型免疫反应减弱而 Th2 型免疫反应异常增强,从而导致哮喘等过敏性疾病的发生^[20]。这些研究阐述了肠道菌群与机体免疫、机体免疫与哮喘、菌群与哮喘之间的关系,为阐明肠道菌群在哮喘等过敏性疾病发生、发展中的作用提供了理论依据。

目前,冬病夏治方穴位贴敷治疗哮喘的临床研究较多,未见有该方在菌群组学方面相关的研究。本研究拟通过病理学检测方法对豚鼠肺组织进行苏木素-伊红(HE),马松(Masson)染色,观察冬病夏治方对哮喘豚鼠肺部炎症及胶原纤维沉积的改善情况,评价冬病夏治方对哮喘豚鼠的治疗作用;采用 Illumina HiSeq 平台测序的肠道菌群生物群落高通量测序方法对豚鼠肠道菌群进行测序,比较哮喘豚鼠与健康豚鼠、经冬病夏治方治疗豚鼠的肠道菌群构成及多样性,研究经冬病夏治方治疗后哮喘豚鼠肠道菌群的变化与哮喘的关系,从微生物组学角度探索冬病夏治方治疗哮喘可能的机制。

1 材料

1.1 动物 普通级豚鼠,雄性,体质量 250 ~ 300 g,由南方医科大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(粤)2016-0041,动物饲养于南方医科大学实验动物中心,饲养场地使用许可证号为 00158790,光照节律 12 h/12 h,室内温度(23 ± 2) °C,相对湿度 50% ~ 60%,饲养环境安静、通风。实验动物给予标准饲料、少量蔬菜和清洁饮水。动物实验的开展符合南方医科大学实验动物伦理委员会的有关规定和要求,伦理批准编号为 L2016113。

1.2 药品与试剂 冬病夏治方由芥子(Sinapis Semen),细辛(Asari Radix et Rhizoma),甘遂(Euphorbia Kansui),延胡索(Corydalis Rhizoma),麻黄(Ephedrae Herba),黄芩(Scutellariae Radix)6 味中药组成(康美药业,批号分别为 150205361,150411011,150401021,151122129,160604161,151101271),饮片经南方医科大学中药鉴定教研室刘传明教授鉴定,均为正品。冬病夏治方的制备,将芥子、细辛、甘遂、延胡索、麻黄、黄芩(2:2:1:2:1:1)混合粉碎,过 6 号筛;取药粉 10 g,以生姜汁 10 mL 调和成 0.5 cm × 0.5 cm 大小的药贴。地塞米松磷酸钠注射液(广州白云山天心制药股份有限公司,批号 140322)。卵蛋白(OVA),trizol 试剂(美国 Sigma 公司,批号分别为 A5503, T9424);弗氏完全佐剂(德国 Serva 公司,批号 12261.01); Bestar™

qPCR RT 试剂盒, Bestar™ qPCR MasterMix (Taq man Probe) (丹麦 DBI 公司,批号分别为 2021027,2020998);粪便样品总 DNA 磁珠法提取试剂盒(深圳市易瑞生物技术有限公司,批号 20160928);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒,马松(Masson)三色染色试剂(北京索莱宝生物科技有限公司,批号分别为 20160922,20170301)。三氯甲烷,异丙醇,75%乙醇,多聚甲醛,水合氯醛,蒸馏水均为分析纯。

1.3 仪器 10 ~ 100 μL,100 ~ 1 000 μL 移液枪,PCR 八连管(德国 Eppendorf 公司);CP225D 型电子天平(上海佑科仪器仪表有限公司);CP-6800 型动物电推剪(Codos 公司);RM2245 型石蜡切片仪,EG1160 型包埋机(德国 Leica 公司);LV100D 型光学显微镜(日本 Nikon 公司);ABI-1;ViiA7 Dx 型 PCR 仪(美国 ABI 公司);Illumina HiSeq 型平台测序(广东美格基因科技有限公司)。

2 方法

2.1 分组 取豚鼠 75 只,随机分为 5 组,分别为空白组、模型组、地塞米松磷酸钠组、穴位给药组、非穴位给药组,每组 15 只。

2.2 豚鼠哮喘模型的建立 参考 Murad 等^[21]豚鼠哮喘模型建立方法并进行改良,采用 OVA 腹腔注射致敏并雾化吸入激发。除空白组外,各组豚鼠均建立哮喘模型。实验第 1 天,每只豚鼠腹腔注射含 Al(OH)₃ 1 mg 的 10% OVA 生理盐水溶液 1 mL 进行致敏。第 14 天,用 1% 卵蛋白生理盐水溶液超声雾化吸入激发哮喘,隔天 1 次,每次 10 min,到豚鼠开始出现呼吸困难、点头呼吸、甚至腹肌痉挛等症状为止,连续雾化 14 d;空白组则使用生理盐水进行雾化。

2.3 给药 造模成功后开始给药,地塞米松磷酸钠组腹腔注射地塞米松磷酸钠注射液(0.5 mg·kg⁻¹);穴位给药组给予冬病夏治方贴,贴于大椎、肺腧、肾腧穴上,背部均取双侧(于给药前进行背部剃毛);非穴位给药组给予冬病夏治方贴,贴于背部除穴位给药组中 3 个穴位外的其他皮肤处,共贴 6 处(于给药前进行背部剃毛)。各组给药每次贴敷 2 h,隔天 1 次,共 7 次。空白组与哮喘模型组进行正常饲养。

2.4 取材 在末次给药 24 h 后,在 2 h 之内以无菌方式采集各组豚鼠粪便,-80 °C 下冻存。对豚鼠用 10% 水合氯醛腹腔注射进行麻醉,4 mL·kg⁻¹。麻醉后,处死豚鼠,取肺组织,4% 多聚甲醛固定。

2.5 肺组织病理学观察 各组豚鼠肺组织样本在 4% 多聚甲醛固定 24 h 后取出,进行组织梯度脱水

与石蜡包埋。将组织进行纵切面平行切片,切片厚度为 4 μm 。进行组织 HE, Masson 染色,在显微镜下观察豚鼠肺部病理情况。

2.6 总 DNA 的提取与检测 采用易瑞粪便细菌总 DNA 磁珠法提取试剂盒提取豚鼠粪便样本总 DNA,具体操作步骤参照说明书,①称取固体粪便 200 mg 于 2 mL 的离心管中,加入 Stool DNA Buffer A 700 μL ,充分振荡混匀 5 min 左右,180 $\times g$ 离心 1 min。从中取出 50 μL 至新的 1.5 mL 的离心管中,加入 Lysis-Binding Buffer 900 μL ,旋涡振荡混匀,70 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 5 min。180 $\times g$ 离心 5 min,转移上清至干净 1.5 mL 离心管中;②加入混匀的磁珠 20 μL ,旋涡振荡 20 s,静置 4 min,旋涡振荡 20 s,静置 4 min;③置磁力架上,静置 20 s,吸弃上清;④加入 Wash Buffer W 1 500 μL ,旋涡振荡混匀磁珠 15 s,室温静置 3 min;⑤置磁力架上,静置 20 s,吸弃上清;⑥重复步骤③~④ 1 次,并除去所有的液体;⑦加入无水乙醇 750 μL ,旋涡振荡混匀磁珠 15 s;⑧室温静置 3 min,置磁力架上,静置 20 s,尽量吸弃所有上清;⑨重复步骤⑥~⑦ 1 次,并尽量除去所有的液体,加入无水乙醇 750 μL ,旋涡振荡混匀磁珠 15 s,室温静置 3 min,并尽量除去所有的液体;⑩开盖,65 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 10 min;加入 Elution Buffer 或 ddH₂O 100 μL ,盖上管盖,旋涡振荡混匀磁珠 60 s,取出离心管,旋涡振荡 10 s,置磁力架上,静置 2 min,吸取上清至收集管中,并于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.7 16 S rRNA V4 区的 PCR 扩增及 Illumina 测序 对粪便细菌 16 S rRNA 的 V4 区进行扩增。采用引物 PCR 反应体系(20 μL)包括 SYBR Green Master Mix 10 μL ,引物各 0.4 μL ,无菌纯化水 7.2 μL ,细菌总 DNA 2.0 μL 作为模板。本实验采用 16 S rRNA 的 V4 可变区通用引物进行扩增。引物序列为上游引物 5'-GTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3',下游引物 5'-CCGGACTACNVGGGTWTCTAAT-3',引物序列长度为 315 bp。PCR 扩增条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s;52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min,并进行 30 个循环,终止于 4 $^{\circ}\text{C}$ 。PCR 扩增产物使用 2% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测(110 V,20 min)。将扩增产物进行变性凝胶梯度电泳,分析肠道菌群种类变化,全自动凝胶成像系统观察。检测合格后,将提取的 DNA 样品送至广东美格基因科技有限公司采用 Illumina HiSeq2500 测序平台对各样本的 16 S rRNA V4 区 PCR 产物进行测序,得到原始数据和 Reads。PCR

引物由上海生工生物工程有限公司合成。

2.8 生物信息学分析 高通量测序数据进行初步原始序列处理。步骤为拼接序列,去除引物,质量控制,将得到的干净序列筛选嵌合体,并去除嵌合体序列。将高质量序列的生物信息学进行分析,将干净序列聚类成操作分类单元(OTU)。将细菌 16 S rDNA 基因序列之间的距离在 0.03 以内(或基因序列的相似度高 97%)的序列进行聚类归并,生成接近于属的分类操作单元 OTU。Alpha 多样性分析,采用 PD_whole_tree, Shannon 评估指数分别对样本进行多样性分析,其中 PD_whole_tree 指数代表样品物种的丰富度,Shannon 指数同时受到物种丰富度和均度的影响。Beta 多样性分析,用于比较多组样本之间的差别度量,基于 Weighted Unifrac 进行分析。通过比较样本组间丰度差异,找出组间丰度存在显著差异的菌群作为微生物群落标志物。

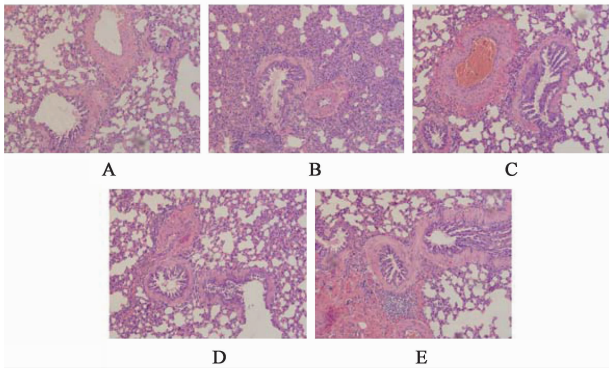
2.9 统计学分析 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差(One-way ANOVA)分析,方差齐者采用 SNK 运法进行比较,方差不齐则采用 Dunnett's T3 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 冬病夏治方对哮喘豚鼠支气管及肺泡结构的影响 空白组豚鼠支气管及肺泡结构清晰正常,支气管黏膜上皮完整,未见明显的气道上皮损伤脱落及气道炎症细胞浸润。而哮喘模型组豚鼠可见支气管黏膜皱襞增多卷曲,管腔狭窄。气道上皮增生,气道壁黏膜、黏膜下可见大量的炎性细胞浸润,提示哮喘模型造模成功。地塞米松磷酸钠组和穴位给药组豚鼠经过治疗后,炎症细胞减少,支气管收缩、气道上皮增生症状改善明显,恢复良好;非穴位给药组豚鼠治疗后,炎症症状亦有改善,炎症细胞减少,支气管收缩、气道上皮增生症状减缓,效果比穴位给药组稍差。见图 1。

3.2 冬病夏治方对哮喘豚鼠气道上皮胶原纤维沉积的影响 空白组豚鼠气管周围未见明显的胶原纤维;哮喘模型组气道上皮下可见明显的胶原纤维沉积(显示蓝色),厚度增加;与模型组比较,地塞米松磷酸钠组、穴位给药组以及非穴位给药组豚鼠经过治疗后,胶原纤维沉积均有不同程度减少,且地塞米松磷酸钠组与穴位给药组胶原纤维沉积减少程度明显,较非穴位给药组显著。见图 2。

3.3 测序信息结果 本实验测序样本数为 68 个,经 QIIME 软件去嵌合体、聚类、分类及 Alpha 多样性



A. 空白组; B. 哮喘模型组; C. 地塞米松磷酸钠组; D. 穴位给药组; E. 非穴位给药组(图 2~6 同)

图 1 冬病夏治方对哮喘豚鼠支气管及肺泡结构的影响(HE, ×200)
Fig. 1 Effect of Dongbing Xiazhi Fang on airway and alveoli of asthmatic guinea pigs (HE, ×200)

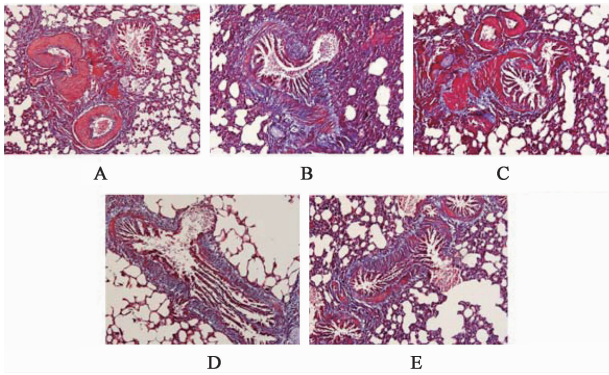


图 2 冬病夏治方对哮喘豚鼠气道上皮胶原纤维沉积的影响 (Masson, ×200)

Fig. 2 Effect of Dongbing Xiazhi Fang to collagen fiber deposition on epithelium of airway of asthmatic guinea pigs (Masson, ×200)

和 Beta 多样性分析。样本序列数在 1 035 ~ 16 226。标准化到 1 035 条。

3.4 冬病夏治方对豚鼠肠道菌群 Alpha 多样性的影响 Shannon 多样性统计分析结果提示,哮喘组豚鼠的 Shannon 多样性指数低于空白组、地塞米松磷酸钠组及穴位给药组,但无显著性差异。提示豚鼠哮喘发病后肠道菌群多样性发生了下降,地塞米松磷酸钠组和穴位给药组经过治疗后,均得到改善。PD_whole_tree 统计分析结果显示,哮喘组豚鼠的 PD_whole_tree 多样性指数均低于空白组、地塞米松磷酸钠组、穴位给药组以及非穴位给药组,且与空白组、地塞米松磷酸钠组、穴位给药组比较有显著性差异 ($P < 0.05$),与非穴位给药组比较无显著性差异,表明豚鼠哮喘发病后,肠道菌群的多样性显著降低,3 个治疗组经过治疗后得到不同程度的改善,且穴位给药组比非穴位给药组改善程度大。见图 3。

3.5 冬病夏治方对豚鼠肠道菌群 Beta 多样性的影

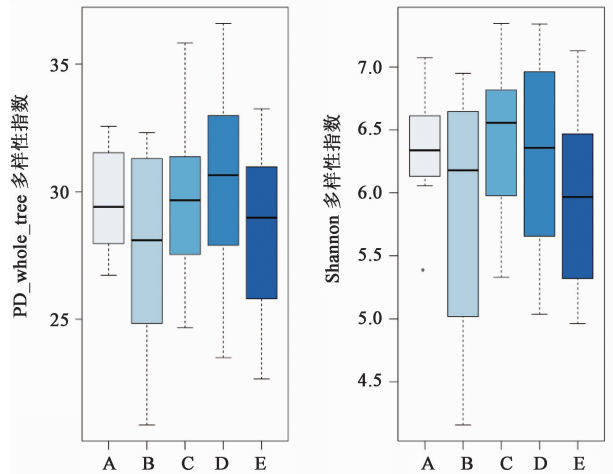


图 3 冬病夏治方对豚鼠肠道菌群 Alpha 多样性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

Fig. 3 Effect of Dongbing Xiazhi Fang on Alpha diversity index of intestinal flora among 5 groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

响 采用 PCoA 主成分分析法分析,基于 Weighted Unifrac 距离算法进行 Beta 多样性分析,评估微生物群落间的差异。结果显示模型组肠道菌群与空白组明显分开,表明两组间菌群结构差异明显。地塞米松磷酸钠组肠道菌群趋于空白组。穴位给药组比非穴位给药组更靠近空白组,表明穴位给药组菌群结构更接近空白组。见图 4。

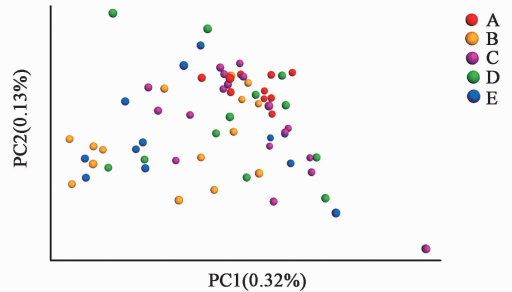


图 4 冬病夏治方对豚鼠肠道菌群 Beta 多样性的影响
Fig. 4 Effect of Dongbing Xiazhi Fang on Beta diversity index of intestinal flora among 5 groups

3.6 冬病夏治方对豚鼠肠道菌群相对丰度及群落结构的影响 对全部样本中微生物的 16 S rRNA 基因 V4 区进行测序,分别在门、属水平的物种差异统计结果。在菌门水平构成上,各组菌门主要由拟杆菌门 (Bacteroidetes), 厚壁菌门 (Firmicutes) 及疣微菌门 (Ferrucomicrobia) 组成,占 80% 以上;其中以拟杆菌相对丰度最高,约占 40% ~ 60%。与空白组及 3 个治疗组比较,哮喘模型组拟杆菌门的丰度最高,厚壁菌门的丰度最低,但无显著性差异。在属水平构成上,普氏菌属 (Prevotella) 在空白组及穴位给药

组中较高,与哮喘模型组比较明显增加($P < 0.05$)。见图 5。

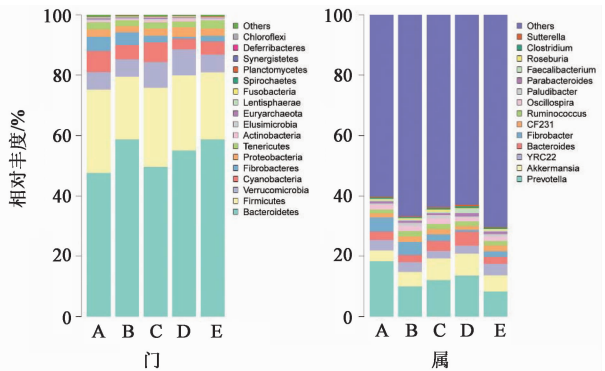


图 5 冬病夏治方对豚鼠肠道菌群相对丰度及群落结构的影响
Fig. 5 Effect of Dongbing Xiazhi Fang on relative abundance of bacteria and integral structure of intestinal flora among 5 groups

3.7 菌群统计学分析结果 采用 LEfSe 统计分析方法,寻找微生物群落标志物。对各组肠道菌群的 LEfSe 分析结果显示,哮喘模型组与空白组比较,普雷沃氏菌科(Prevotellaceae),普氏菌属(*Prebotella*),厚壁菌门(Firmicutes),Streptophyta,Chloroplast,节杆菌(*Arthrobacter*)显著减少,拟杆菌属(*Bacteroidetes*),拟杆菌目(*Bacteroidales*),Bacteroidia,鞘脂单胞菌目(Sphingomonadales),鞘脂单胞菌科(Sphingomonadaceae),鞘脂单胞菌属(*Sphingomonas*),粪球菌属(*Coprococcus*)则显著增加。

与穴位给药组比较,纤维杆菌属(*Fibrobacter*),RF16,螺杆菌属(*Helicobacter*),消化球菌属(*Peptococcaceae*)在哮喘模型组中富集。而在穴位给药组中,韦荣氏菌科(*Veillonellaceae*),理研菌科(*Alistipes*),放线菌纲(*Actinobacteria*),伯克氏菌门(*Burkholderiales*),考拉杆菌属(*Phascolarctobacterium*),放线菌门(*Actinobacteria*),芽孢杆菌纲(*Bacilli*),丛毛单胞菌科(*Comamonadaceae*),*Parabacteroides*,代尔夫特菌属(*Delftia*),梭菌科(*Clostridiaceae*),脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*),互养菌属(*Synergistes*),梭菌属(*Clostridium*),*Desulfoibronaceae*,*Blautia*菌属,*Allobaculum*,弧形杆菌属(*Campylobacter*),小类杆菌属(*Dialister*),氨基酸球菌属(*Acidaminococcus*),巨型球菌属(*Megasphaera*),黄单胞菌属(*Xanthomonadaceae*),寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)较模型组显著增加。见图 6。

4 讨论

“冬病夏治”疗法作为一种替代疗法,广泛应用

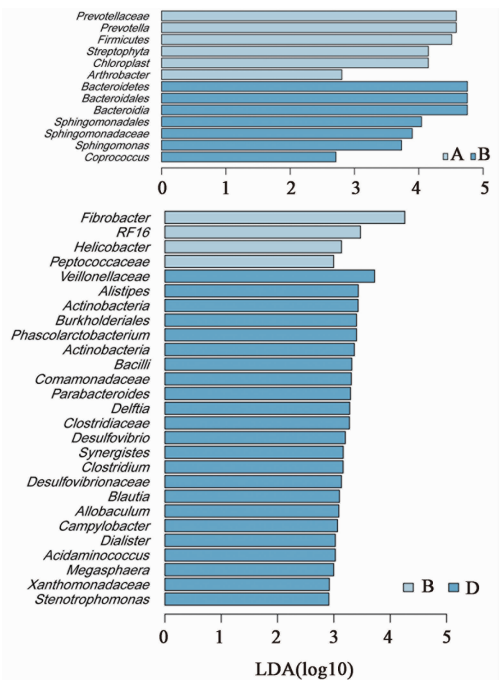


图 6 组间差异菌属的 LEfSe 统计分析
Fig. 6 LEfSe statistical results of intestinal flora among 5 groups

于临床上哮喘的预防与治疗。中药应用于哮喘治疗历史悠久,具有临床效果良好,副作用小等优点^[9],体现了中医药的优势。治疗哮喘的“冬病夏治”处方源于清代名医张璐所著的《张氏医通》,处方包含白芥子、细辛、甘遂、延胡索、麻黄与黄芩 6 味中药。该疗法由于效果显著与低副作用而被广泛应用。该疗法作为丰富的中药传统疗法中的一种,可作为一种治疗哮喘理想的替代疗法。

豚鼠对组织胺极敏感,在研究哮喘发病机制与治疗机制中应用广泛,故本实验采用豚鼠为实验动物。HE 染色结果表明,豚鼠哮喘模型成功建立,经过冬病夏治方穴位贴敷治疗后,哮喘豚鼠气道高反应性与炎症得到明显改善,表明冬病夏治方在哮喘治疗中具有良好的疗效,而经冬病夏治方非目标穴位贴敷后,哮喘症状亦得到一定的改善,但效果明显不如穴位贴敷组。Masson 染色结果显示,哮喘豚鼠气道上皮下及气管周围胶原纤维沉积明显,经冬病夏治方穴位贴敷治疗后,胶原纤维沉积明显减少,表明起到良好的哮喘治疗效果,而经冬病夏治方非目标穴位贴敷进行治疗后,胶原纤维沉积亦有减少,但效果明显不如穴位贴敷组。综上所述可得出结论,在冬病夏治方治疗哮喘过程中,大椎、肺腧、肾腧穴发挥着关键的作用,体现了传统中医药穴位疗法的优势所在。

肠道菌群是一个及其复杂的微生态系统,与宿

主的生理、病理、代谢等有着密不可分的相互作用^[22]。肠道菌群与过敏性疾病的相互关系研究备受关注,Tumbaugh 等^[23]研究发现,人肠道中起核心作用的共生细菌主要有变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门及放线菌门。但这些细菌的比例只占肠道内所有细菌的 0.5%,随着测序参考株数量增加以及深层抽样的增长,这些核心菌群可能也会发生变化。本实验利用 16 S rRNA 测序技术对豚鼠肠道菌群进行检测分析,实验结果表明,哮喘豚鼠的肠道菌群多样性指标均低于空白组与治疗组。生物多样性指标是呈现生物多样性的现状、趋势以及各种活动对生物多样性影响的重要标志,其可描述类群数目以及种类中个体分配的均匀性。李春燕等^[24]研究发现,肠道菌类群多样性降低与哮喘病因素关系最为密切,提示通过改变饮食习惯、合理膳食结构及益生菌干预等途径改变肠道中“有益菌”、“有害菌”比例,纠正肠道菌群失衡将在今后哮喘等过敏性疾病的诊疗和机制研究中发挥重要作用。

哮喘发病后,豚鼠肠道菌群多样性降低,多种细菌比例发生了变化,与哮喘模型组比较,冬病夏治方穴位贴敷给药后豚鼠的肠道菌群多样性升高,普氏菌属显著增多,拟杆菌门减少,变形菌增多;哮喘模型组厚壁菌数目较空白组及各给药组减少。结果提示,普氏菌属、拟杆菌门、变形菌、厚壁菌门在哮喘发病及治疗中可能作为标志物发挥重要的作用,可在后续的研究中对其进行深入的研究。冬病夏治方穴位贴敷给药可能通过调控肠道菌群的构成,影响机体的免疫,改善哮喘产生的肺部炎症及气道上皮及周围胶原纤维沉积,起到良好的治疗作用,其具体的作用机制,仍需进行进一步的研究。

[参考文献]

[1] Sagar S, Akbarshahi H, Uller L. Translational value of animal models of asthma: challenges and promises[J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 759(3): 272-277.

[2] Bahadori K, Doyle-Waters M M, Marra C, et al. Economic burden of asthma: a systematic review[J]. *BMC Pulm Med*, 2009, doi:10.1186/1471-2466-9-24.

[3] 徐凤,肖韩艳,周淑芬,等.柴朴汤对哮喘模型大鼠气道炎症及 ERK/p38 MAPK 信号通路的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(2):104-109.

[4] Ablimit A, Hasan B, Luw J, et al. Changes in water channel aquaporin 1 and aquaporin 5 in the small airways and the alveoli in a rat asthma model[J]. *Micron*, 2013, 45(2):68-73.

[5] Fitz Gerald J M, Shahidi N. Achieving asthma control in patients with moderate disease [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 125(2): 307-311.

[6] Williamson P A, Short P M, Vaidyanathan S, et al. Inhaled and systemic corticosteroid response in severe asthma assessed by alveolar nitric oxide: a randomized crossover pilot study of add-on therapy [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2013, 75(1): 93-102.

[7] Bosnjak B, Stelzmueller B, Erb K J, et al. Treatment of allergic asthma: modulation of Th2 cells and their responses [J]. *Respir Res*, 2011, 12(1):114-120.

[8] 刘凯,黄艳君.《张氏医通》中白芥子涂法方之探讨 [J]. *内蒙古中医药*, 2014, 33(17):157.

[9] 顾红丹.冬病夏治消喘穴位贴敷疗法对儿童哮喘复发及 Th1/Th2 细胞因子的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(4):1014-1016.

[10] WEN B L, LIU B Y, PENG J, et al. Clinical research of acupoint application for "treatment of winterdisease in summer" used to prevent and treat bronchial asthma in children [J]. *J Trad Chin Med*, 2012, 32(1):31-39.

[11] 闫晓明,张力文,王宗润,等.肠道菌群与支气管哮喘关系的研究进展 [J]. *中国综合临床*, 2015, 31(5): 475-477.

[12] 彭晨,郭胤仕.肠道菌群在过敏性支气管哮喘发生和发展中的作用 [J]. *国际呼吸杂志*, 2015, 35(3): 219-222.

[13] 张利利,郑鹏远,王新亭,等.双歧杆菌对食物过敏小鼠肠道屏障功能及 Th1/Th2 细胞因子的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(11):1091-1097.

[14] Round J L, Lee S M, Li J, et al. The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota [J]. *Science*, 2011, 332(6032): 974-977.

[15] Sansonetti P J. Microbiota and the immune system, an amazing mutualism forged by co-evolution [J]. *Semin Immunol*, 2013, 25(5):321-322.

[16] Sagar S, Vos A P, Morgan M E, et al. The combination of *Bifidobacterium breve* with non-digestible oligosaccharides suppresses airway inflammation in a murine model for chronic asthma [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842(4):573-783.

[17] Harb H, van Tol E A, Heine H, et al. Neonatal supplementation of processed supernatant from *Lactobacillus rhamnosus* GG improves allergic airway inflammation in mice later in life [J]. *Clin Exp Allergy*, 2013, 43(3):353-364.

[18] Maslowski K M, Vieira A T, Ng A, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and

- chemoattractant receptor GPR43 [J]. *Nature*, 2009, 461(7268):1282-1286.
- [19] Trompette A, Gollwitzer E S, Yadava K, et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis[J]. *Nat Med*, 2014, 20(2):159-166.
- [20] 肖小芹,贺艳萍,邓桂明,等. 哮喘穴位敷贴对哮喘大鼠 Th1/Th2 免疫平衡的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2016, 36(5):6-9, 45.
- [21] Murad H A, Hasanin A H. The anti-inflammatory effects of 1, 1 dimethyl-4-phenylpiperazinium (DMPP) compared to dexamethasone in a guinea pig model of ovalbumin induced asthma[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014, 18(15):2228-2236.
- [22] 马宁,刘希望,孔晓军,等. 长期饲喂高脂饲料对大鼠血脂、肝及肠道菌群的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2017, 48(7):1271-1280.
- [23] Tumbaugh P J, Hamady M, Yatsunenko T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins [J]. *Nature*, 2009, 457(7228):480-484.
- [24] 李春燕,李俊红,张海员,等. 支气管哮喘患者肠道菌群多样性变化[J]. *科技导报*, 2012, 30(30):63-67.

[责任编辑 全燕]