

## 补肺汤对慢性阻塞性肺疾病肺气虚证大鼠肺-肠轴的影响

沈俊希<sup>1</sup>, 朱星<sup>1\*</sup>, 陈云志<sup>1</sup>, 刘怀全<sup>1</sup>, 褚璨灿<sup>2</sup>, 张钰<sup>1</sup>, 苏钢<sup>1</sup>, 李文<sup>1</sup>, 徐昌君<sup>1</sup>,  
童平珍<sup>3</sup>, 余欣然<sup>1</sup>, 杨光勇<sup>1</sup>, 邓颖<sup>1</sup>

(1. 贵州中医药大学, 贵阳 550025;

2. 安顺市人民医院, 贵州安顺 561000; 3. 贵州中医药大学第二附属医院, 贵阳 550003)

**[摘要]** 目的:研究补肺汤对慢性阻塞性肺疾病(COPD)肺气虚证大鼠肠道菌群的影响,探讨中药调控肠道菌群进而恢复肺-肠轴平衡的作用机制。方法:将大鼠随机分为7组,每组12只,即空白组、模型组、粪菌移植(FMT)组、地塞米松组及补肺汤低、中、高剂量组。除空白组外,其余各组采用香烟和锯末烟熏联合气管内滴入脂多糖(LPS)的方法建立COPD肺气虚证大鼠模型。补肺汤低、中、高剂量组分别灌胃补肺汤药液(3.645、7.29、14.58 g·kg<sup>-1</sup>),FMT组给予粪菌液灌肠(10 mL·kg<sup>-1</sup>),地塞米松组给予醋酸地塞米松片混悬液灌胃(0.135 mg·kg<sup>-1</sup>),空白组和模型组大鼠灌胃等量蒸馏水,连续干预28 d后收集新鲜粪便,进行16S rRNA基因测序,取肺脏及结肠组织苏木素-伊红(HE)染色后进行病理形态学观察,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测肺组织肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-8(IL-8)含量。结果:与空白组比较,模型组肺组织结构重度异常,肺泡萎缩塌陷,伴随炎症细胞重度浸润;与模型组比较,补肺汤高剂量组损伤程度明显改善,肺泡结构基本正常,炎症细胞浸润减少。与空白组比较,模型组结肠组织结构重度异常,黏膜层上皮细胞糜烂脱落,炎症细胞数量增多,黏膜下层水肿,间隙增大;与模型组比较,补肺汤中、高剂量组损伤程度明显改善,黏膜层上皮细胞排列整齐紧密,未见明显变性,黏膜层仅少量炎症细胞浸润。与空白组比较,模型组肺组织TNF- $\alpha$ 、IL-8含量显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,补肺汤低、中、高剂量组肺组织TNF- $\alpha$ 、IL-8含量显著降低( $P<0.01$ )。补肺汤明显调节模型大鼠的物种数量及Alpha、Beta多样性,纠正肠道菌群回归正常丰度与多样性,正向调节COPD肺气虚证模型大鼠的4种差异菌门(厚壁菌门、变形菌门等)与13种差异菌属(苏黎世杆菌属、乳杆菌属、厌氧螺菌属、肠单胞球菌属等),并下调2种碳水化合物代谢通路功能,包括磷酸戊糖途径(非氧化分支)I和还原型戊糖磷酸循环。结论:补肺汤可调整肠道菌群物种丰度和多样性,影响代谢通路功能,修复肺及结肠组织结构,调节炎症因子水平,进而改善COPD肺气虚证,作用机制可能与其调节炎症相关的肠道菌群而恢复COPD肺气虚证肺-肠轴平衡有关。

**[关键词]** 慢性阻塞性肺疾病(COPD); 16S rRNA; 补肺汤; 肠道菌群; 肺-肠轴; 经典名方; 炎症因子

**[中图分类号]** R22;R28;R96;R378.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)07-0047-10

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220757 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220812.1324.013.html>

**[网络出版日期]** 2022-08-12 16:30:19

## Effect of Bufeitang on Lung-gut Axis in Rats with Lung Qi-deficiency Syndrome of Chronic Obstructive Pulmonary Disease

SHEN Junxi<sup>1</sup>, ZHU Xing<sup>1\*</sup>, CHEN Yunzhi<sup>1</sup>, LIU Huaiquan<sup>1</sup>, CHU Cancan<sup>2</sup>, ZHANG Yu<sup>1</sup>, SU Gang<sup>1</sup>,  
LI Wen<sup>1</sup>, XU Changjun<sup>1</sup>, TONG Pingzhen<sup>3</sup>, YU Xinran<sup>1</sup>, YANG Guangyong<sup>1</sup>, DENG Ying<sup>1</sup>

(1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Guiyang 550025, China;

2. People's Hospital of Anshun City, Anshun 561000, China;

3. The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of TCM, Guiyang 550003, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Bufeitang on intestinal flora of rats with lung Qi-

**[收稿日期]** 2022-05-20

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81960830)

**[第一作者]** 沈俊希,在读硕士,从事中医治则治法研究,E-mail:406708738@qq.com

**[通信作者]** \*朱星,博士,教授,博士生导师,从事中医治则治法及各家学说研究,E-mail:11863362@qq.com

deficiency syndrome of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and to explore the mechanism of traditional Chinese medicine in regulating intestinal flora and thus restoring the balance of lung-gut axis. **Method:** A total of 84 rats were randomly divided into 7 groups, including blank group, model group, fecal bacterial transplantation (FMT) group, dexamethasone group and low, medium and high dose groups of Bufeitang, 12 rats in each group. Except for the blank group, cigarette and sawdust fumigation combined with intratracheal instillation of lipopolysaccharide (LPS) were used to establish the COPD rat model with lung Qi-deficiency syndrome in all other groups. The low, medium and high dose groups of Bufeitang were intragastric administrated with Bufeitang (3.645, 7.29, 14.58 g·kg<sup>-1</sup>), the FMT group was given fecal bacteria liquid enema (10 mL·kg<sup>-1</sup>), dexamethasone group was given dexamethasone acetate tablet suspension by gavage (0.135 mg·kg<sup>-1</sup>), the blank group and model group were given equal amount of distilled water. Fresh feces were collected after 28 d of continuous intervention for 16S rRNA gene sequencing. Lung and colon tissues were stained with hematoxylin-eosin (HE) for pathomorphological observation, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to detect the contents of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-8 (IL-8) in lung tissues. **Result:** Compared with the blank group, the model group showed severe abnormal lung tissue structure with alveolar atrophy and collapse accompanied by severe inflammatory cell infiltration. Compared with the model group, the extent of injury was significantly improved, and inflammatory cell infiltration was reduced with basically normal alveolar structure in the high dose group of Bufeitang. Compared with the blank group, the model group had severely abnormal colonic tissue structure, the epithelial cells in the mucosal layer were eroded and shed, the number of inflammatory cells increased, the submucosal layer was edematous and the gap was enlarged. Compared with the model group, the extent of damage was significantly improved in the medium and high dose groups of Bufeitang, the epithelial cells in the mucosal layer were neatly and closely arranged, with only a small amount of inflammatory cell infiltration and no significant degeneration. Compared with the blank group, the TNF- $\alpha$  and IL-8 levels of lung tissue in the model group were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the TNF- $\alpha$  and IL-8 levels of lung tissues in the low, medium and high dose groups of Bufeitang were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). Bufeitang significantly modulated the number of bacteria species as well as alpha and beta diversity of model rats, corrected the return of intestinal flora to normal abundance and diversity, and positively regulated 4 differential phyla (such as Firmicutes, Proteobacteria) and 13 differential genera (such as *Turicibacter*, *Lactobacillus*, *Anaerobiospirillum*, *Intestinimonas*) in COPD model rats with lung Qi-deficiency syndrome, and down-regulated 2 carbohydrate metabolic pathway functions, including the pentose phosphate pathway (non-oxidative branch) I and the Calvin-Benson-Bassham cycle. **Conclusion:** Bufeitang can modulate the abundance and diversity of intestinal flora species, affect the function of metabolic pathways, repair the structure of lung and colon tissues, regulate the level of inflammatory factors, and thus improve COPD with lung Qi-deficiency syndrome. The mechanism may be related to its regulation of inflammation-related intestinal flora to restore the balance of lung-gut axis in COPD with lung Qi-deficiency syndrome.

**[Keywords]** chronic obstructive pulmonary disease (COPD); 16S rRNA; Bufeitang; intestinal flora; lung-gut axis; famous classical formulas; inflammatory factor

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是一种进行性呼吸系统疾病,由于人口老龄化和风险因素(空气污染、职业粉尘和吸食香烟等)暴露的增加,我国COPD总体患病率近几十年仍在持续上升。据2018年中国COPD流行率调查研究显示,40岁及以上的成年人COPD总体患病率约13.6%<sup>[1]</sup>,远高于2002—2004年

调查的总体患病率8.2%<sup>[2]</sup>。我国的COPD门诊患者经济负担较重且疾病稳定性与预防不足,患者中度至重度气流阻塞、急性加重和其他并发症的风险普遍存在<sup>[3]</sup>。因此,对于阐明COPD发病机制,探寻有效防治药物是当前研究重点。目前学界普遍认为炎症反应、氧化应激、细胞自噬和细胞凋亡等病理

机制均能驱动 COPD 的发生发展<sup>[4-5]</sup>,但并不能完全解释 COPD 的发病机制。已有研究表明,肠道菌群和肺之间受肺-肠轴的串扰影响,与 COPD 的发生发展密切相关<sup>[6]</sup>。COPD 患者普遍存在肠道菌群失调的情况,肠道致病菌数量增多将加重 COPD 患者肺部感染风险<sup>[7]</sup>。肠道菌群失衡对肠道黏膜屏障功能和机体免疫反应将造成不利影响,导致局部和全身炎症介质水平升高,是促进 COPD 发生发展的关键作用机制<sup>[8]</sup>。通过药物调节肠道菌群平衡、改善炎症反应或将成为防治 COPD 的新方向。

补肺汤出自元代李仲南的《永类铃方》<sup>[9]</sup>,全方由人参、黄芪、熟地黄、五味子、紫菀、桑白皮 6 味中药组成,诸药合用金水相生,肺肾双补,共奏补肺益气,止咳平喘之功,是临床治疗肺系疾病的经典名方。COPD 属于中医学“肺胀”“喘证”或“喘病”等疾病范畴,其主要病因病机为虚、痰、瘀互结<sup>[10]</sup>。临床选用补肺汤治疗 COPD,方药与病机相互契合,对于 COPD 肺气虚证、肺肾气虚证均有良好的临床疗效<sup>[11-12]</sup>。同时,本课题组前期基于“肺与大肠相表里”“肺合大肠”理论,已就中药复方保护肺-肠轴的作用机制<sup>[13]</sup>和补肺汤干预 COPD 肺气虚证作用机制的文献报道,故本研究选择 COPD 肺气虚证模型大鼠,探讨补肺汤是否通过调节肠道菌群相对丰度及多样性、控制炎症因子水平、改善肺和肠道组织形态,从而达到调节 COPD 肺-肠轴平衡的目的,为全面阐释该方干预 COPD 的作用机制、增加 COPD 的临床治疗选择提供实验依据。

## 1 材料

DHG-9240A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械厂),BPH-9042 型精密恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司),CMax Plus 型酶标仪(美国 Molecular Devices 公司),HM 355S 型石蜡切片机、NanoDrop 2000 型超微量分光光度计(美国 Thermo 公司),QL-901 型旋涡振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),TS-2 型脱色摇床(海门市麒麟医用仪器厂),MF53 型光学显微镜(广州市明美光电技术有限公司),T100 型梯度聚合酶链式反应(PCR)仪(美国 Bio-Rad 公司),NovaSeq 6000 型高通量测序仪(美国 Illumina 公司)。

脂多糖(LPS,北京索莱宝科技有限公司,批号 L8880),醋酸地塞米松片[重庆科瑞制药(集团)有限公司,批号 610003],伊红染色液、苏木素染色液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为

G1002、G1004),高保真 PCR 预混液(美国 New England Biolabs 公司,货号 F532S,含 GC 缓冲液),GeneJET 凝胶回收试剂盒(美国 Thermo 公司,货号 K0692),TruSeq PCR-Free DNA 建库试剂盒(美国 Illumina 公司,货号 FC-121-3003),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(IL)-8 酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(泉州市睿信生物科技有限公司,批号分别为 RX302058R、RX302854R);人参(批号 201201)、黄芪(批号 210101)、熟地黄(批号 200801)、醋五味子(批号 200801)、紫菀(批号 200301)、桑白皮(批号 200401)饮片均由北京本草方源(亳州)药业有限公司生产,购自北京同仁堂贵阳药店有限责任公司,并经贵州中医药大学药学院孙庆文教授鉴定人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* 的根和根茎的炮制加工品,黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* 的根的炮制加工品,熟地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* 的块根的炮制加工品,醋五味子为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* 的成熟果实的炮制加工品,紫菀为菊科植物紫菀 *Aster tataricus* 的根和根茎的炮制加工品,桑白皮为桑科植物桑 *Morus alba* 的根皮的炮制加工品。

雄性 Wistar 大鼠 84 只,体质量(220±20) g,SPF 级,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,合格证号 SCXK(湘)2019-0004。本实验经贵州中医药大学实验动物伦理审查委员会批准,伦理审查编号 20210030。

## 2 方法

**2.1 药液制备**<sup>[15]</sup> 称取黄芪 24 g、熟地黄 24 g、人参 9 g、紫菀 9 g、桑白皮 9 g、醋五味子 6 g,加 5 倍量水浸泡 30 min,武火煮沸后用文火继续煎煮 30 min,使用医用纱布过滤药液,水浴浓缩成生药质量浓度为 1.5 g·mL<sup>-1</sup> 的补肺汤水煎液,密封储存于 4 °C 冰箱中备用。

**2.2 粪菌液的制备** 参照文献[16]并加以改良,灌肠当天收集空白组大鼠 2 h 内的新鲜粪便,按照粪便与生理盐水 1:5 的比例,置于无菌烧杯中充分混合;经孔径为 0.25 mm 的不锈钢滤网过滤 3 次,除去未吸收的食物残渣和小颗粒物质;无菌过滤后将滤液以 5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min(离心半径 8 cm),收集上清液,于 2 h 内灌肠。

**2.3 模型的制备** 参照文献[17]所载方法并加以改良,采用香烟和锯末烟熏联合气管内滴入 LPS 的方法,建立 COPD 肺气虚证大鼠模型。将 84 只大鼠

适应性喂养1周后随机分为7组,每组12只。分别为空白组、模型组、粪菌移植(FMT)组、地塞米松组及补肺汤低、中、高剂量组。造模第1天和第14天,将各组大鼠麻醉后仰卧保定,切开颈部皮肤,分离皮下组织及肌肉,暴露气管,将注射针头在环状软骨之间连接处向肺侧刺入,空白组注入生理盐水200  $\mu\text{L}$ ,其余6组注入 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  LPS溶液200  $\mu\text{L}$ ,药液注入后即刻将大鼠直立,并左右摇晃15 s,使药液均匀分布,随后缝合肌肉、皮下组织和皮肤并做好伤口消毒。第2~13天和15~23天,除空白组外,其余6组使用锯末50 g+香烟烟丝7.11 g混合点燃烟熏,每日烟熏1次,每次30 min;第24~30天,改为每日烟熏3次,每次30 min。COPD模型复制成功与否依据模型组大鼠肺组织形态学改变,肺气虚证模型复制成功与否依据症状体征变化。

**2.4 给药干预** 参照人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值,大鼠等效剂量相当于人的6.3倍。补肺汤低、中、高剂量组每日按人体临床常用剂量的0.5、1、2倍折算后给予大鼠补肺汤灌胃(按生药量计算分别为 $3.645$ 、 $7.29$ 、 $14.58\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),FMT组按 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给予粪菌液灌肠,地塞米松组按剂量 $0.135\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃给予醋酸地塞米松片混悬液,空白组和模型组按 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃蒸馏水。所有组别连续给药干预28 d,每日1次。

**2.5 样本采集** 在末次给药24 h后,于麻醉状态下处死大鼠,打开胸腔,摘取肺脏组织;随后打开腹腔,截取结肠组织并纵行剖开后取结肠内容物于无菌离心管储存,用生理盐水将结肠内壁残留的附着物冲洗干净;将结肠内容物置入液氮中保存备用,肺脏和结肠组织一部分用4%多聚甲醛固定、一部分置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

**2.6 苏木素-伊红(HE)染色检测大鼠组织病理改变** 按照HE染色操作规范,取4%多聚甲醛固定的肺、结肠组织,经常规乙醇梯度洗脱、石蜡包埋后切片,石蜡切片脱蜡复水,苏木素染细胞核,伊红染细胞质,脱水封片,利用光学显微镜镜检,图像采集分析依次进行。

**2.7 肺组织TNF- $\alpha$ 、IL-8水平的检测** 取肺组织,加入裂解液机械研磨后,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min(离心半径8 cm),取上清液,使用ELISA试剂盒检测肺组织TNF- $\alpha$ 和IL-8的含量,实验步骤严格按照说明书进行,使用酶标仪在450 nm处测定吸光度 $A$ ,计算样品浓度。

**2.8 16S rRNA测序** 从每组中随机选3个样本进

行粪便DNA抽取和肠道菌群多样性检测,引物合成及测序委托重庆精准医疗产业技术研究院有限公司完成。先抽取粪便DNA并进行总DNA质检,随后使用高保真PCR预混液对基因组DNA进行PCR扩增,扩增选择V4可变区域,序列为上游引物515F(5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3'),下游引物806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'),引物长度292 bp。根据PCR产物浓度用GeneJET试剂盒进行PCR产物纯化。使用TruSeq PCR-Free DNA建库试剂盒进行文库构建,构建好的文库经Qubit 2.0进行定量和检测。检测合格后使用高通量测序仪进行上机测序。

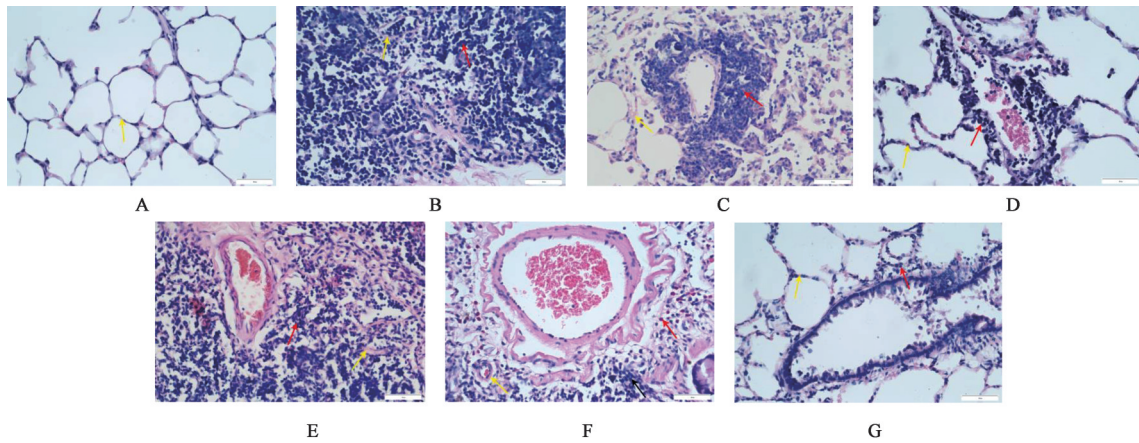
**2.9 统计学分析** 实验数据采用GraphPad Prism 8.0软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 $t$ 检验及非参数检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 大鼠一般症状、体征观察** 空白组大鼠精神状态良好,被毛有光泽,呼吸平稳,鼻部未见分泌物。模型组大鼠出现蜷伏少动,拱背蜷卧,被毛蓬起无光泽,呼吸急促,鼻部分泌物较多,偶可闻及咳嗽及气道痰鸣音,进食量减少,随着造模时间的延长,上述症状逐渐加重。通过药物干预后,各给药组大鼠上述症状和体征较模型组均有不同程度的改善,其中补肺汤高剂量组症状改善明显。

**3.2 对大鼠肺组织的影响** 由图1可知,空白组大鼠肺组织结构正常,肺泡结构清晰,肺泡壁未见增厚,组织未见明显炎症细胞浸润。模型组大鼠肺组织结构重度异常,大量肺泡萎缩塌陷、肺泡腔消失,肺实质化,伴随炎症细胞重度浸润。FMT组大鼠肺泡腔结构不清晰,肺泡轻度萎缩,肺泡壁轻度增厚,并可见少量巨噬细胞及淋巴细胞浸润。地塞米松组大鼠肺泡结构较为清晰,肺泡壁未见明显增厚,组织可见少量炎症细胞浸润,损伤程度较模型组明显改善。补肺汤低、中剂量组大鼠部分肺泡萎缩塌陷、肺泡腔消失,肺实质化,伴随少量炎症细胞浸润,可见少量未塌陷,损伤程度较模型组稍有改善。补肺汤高剂量组大鼠肺泡结构基本正常,未见明显塌陷,肺泡壁未见明显增厚,组织仅有少量炎症细胞浸润。

**3.3 对大鼠结肠组织的影响** 由图2可知,空白组结肠组织结构正常,黏膜上皮细胞排列整齐紧密,未见明显变性脱落,隐窝数量正常,可见大量杯状细胞,黏膜层炎症细胞数量未见增多。模型组肠组织



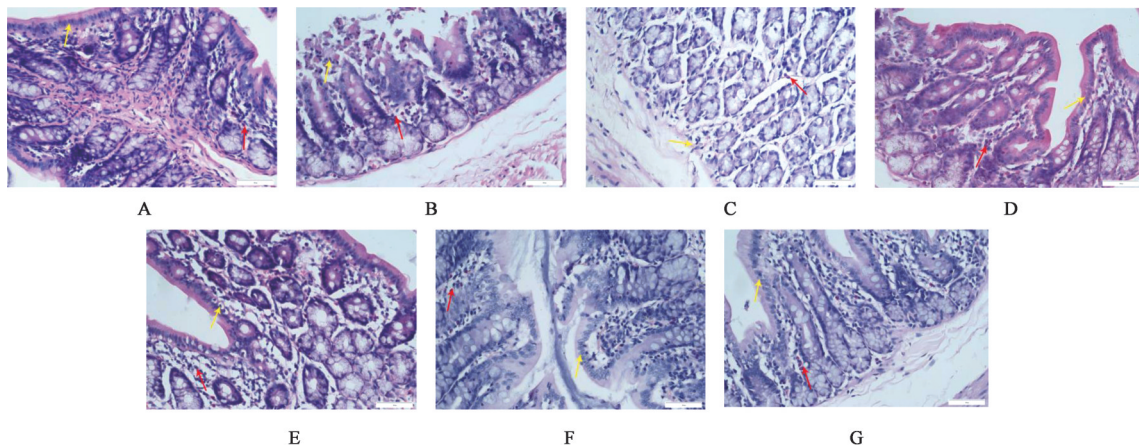
注:A.空白组;B.模型组;C.FMT组;D.地塞米松组;E.补肺汤低剂量组;F.补肺汤中剂量组;G.补肺汤高剂量组(图2-图4同);黄色箭头标示肺泡结构,红色箭头标示炎症细胞

图1 各组大鼠肺组织的病理学变化(HE,×400)

Fig. 1 Histopathological changes of lung tissue of rats in each group (HE,×400)

结构重度异常,黏膜层上皮细胞糜烂脱落,炎症细胞数量增多,黏膜下层水肿,间隙增大。FMT组隐窝上皮细胞未见明显变性,黏膜层轻度水肿,间隙增大。地塞米松组肠组织黏膜层上皮细胞排列整齐紧密,未见明显变性,见少量炎症细胞浸润。补

肺汤低剂量组肠组织较模型组有所改善,黏膜层少量上皮细胞坏死,胞核固缩;黏膜层水肿,间隙增大,并可见少量炎症细胞浸润。补肺汤中、高剂量组肠组织黏膜层上皮细胞排列整齐紧密,未见明显变性,黏膜层见少量炎症细胞浸润。



注:黄色箭头标示结肠黏膜上皮细胞结构,红色箭头标示炎症细胞

图2 各组大鼠结肠组织的病理学变化(HE,×400)

Fig. 2 Histopathological changes of colonic tissues of rats in each group (HE,×400)

**3.4 对COPD肺气虚证大鼠肺组织TNF- $\alpha$ 、IL-8含量的影响** 与空白组比较,模型组TNF- $\alpha$ 、IL-8含量显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,FMT组TNF- $\alpha$ 、IL-8含量明显升高( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),地塞米松组和补肺汤低、中、高剂量组TNF- $\alpha$ 、IL-8含量显著降低( $P<0.01$ ),见表1。但地塞米松组和补肺汤高剂量组的TNF- $\alpha$ 含量差异无统计学意义。

### 3.5 大鼠肠道菌群测序

**3.5.1 质控分析** 稀释曲线可直接反映测序数据量的合理性并间接反映样本中物种的丰富程度,随

着横轴测序深度增加,纵轴丰度曲线逐渐趋于平缓,表明测序数据量足以反映出肠道物种丰度趋于饱和,不会随着测序深度的增加而增多。提示此次测序量足以反映样品物种的多样性。稀释曲线见增强出版附加材料。

**3.5.2 肠道菌群操作分类单位(OTU)数目** 经高通量测序后,根据不同分组绘制出韦恩图,不同组别用不同颜色花瓣表示,花心部分为所有样品共有的OUT,结果发现7组共有OUT有29个,而空白组、模型组、FMT组、地塞米松组及补肺汤低、中、高

表1 补肺汤对 COPD 肺气虚证模型大鼠肺组织 TNF- $\alpha$  和 IL-8 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 1 Effect of Bufeitang on TNF- $\alpha$  and IL-8 levels in lung tissue of COPD rats with lung Qi-deficiency syndrome ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )  
ng·L<sup>-1</sup>

组别	剂量	TNF- $\alpha$	IL-8
空白组		3.80±0.37	69.78±1.53
模型组		7.36±0.35 <sup>2)</sup>	117.72±1.75 <sup>2)</sup>
FMT组	10 mL·kg <sup>-1</sup>	7.91±0.31 <sup>3)</sup>	128.19±0.26 <sup>4)</sup>
地塞米松组	0.135 mg·kg <sup>-1</sup>	5.04±0.10 <sup>4)</sup>	89.99±0.80 <sup>4)</sup>
补肺汤低剂量组	3.645 g·kg <sup>-1</sup>	6.11±0.11 <sup>4)</sup>	109.69±1.44 <sup>4)</sup>
补肺汤中剂量组	7.290 g·kg <sup>-1</sup>	6.03±0.11 <sup>4)</sup>	109.35±0.68 <sup>4)</sup>
补肺汤高剂量组	14.580 g·kg <sup>-1</sup>	5.02±0.22 <sup>4)</sup>	50.28±7.34 <sup>4)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P<0.05,<sup>2)</sup>P<0.01;与模型组比较<sup>3)</sup>P<0.05,<sup>4)</sup>P<0.01(图3同)

剂量组独有 OUT 分别为 116、98、170、123、121、95、160 个,说明各组间菌群结构差异较大,COPD 肺气虚证模型的肠道菌群 OTU 总数下降,而给药后 OTU 总数有所上升。韦恩分析见增强出版附加材料。

**3.5.3 肠道菌群 Alpha 多样性变化** Alpha 多样性反映的是样本微生物群落多样性,通过对单个样品的多样性分析可以反映样本内的物种丰度及物种多样性。肠道菌群物种多样性常用 Shannon 指数进行衡量,受样本群落中物种丰度和物种均匀度的影响,Shannon 指数越大,说明样品的物种多样性越高。与空白组比较,模型组大鼠的 Shannon 指数明显升高(P<0.05);与模型组比较,补肺汤低、中、高剂量组大鼠的 Shannon 指数具有明显降低(P<0.05, P<0.01),提示肠道菌群物种多样性具有回调趋势。见图 3。

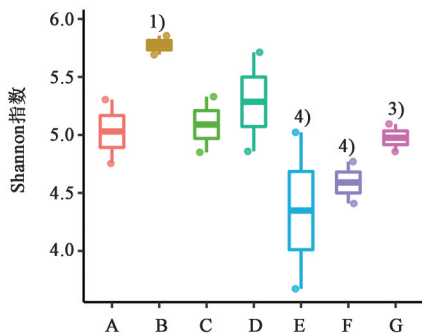


图3 各组大鼠肠道菌群 Shannon 指数分析 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

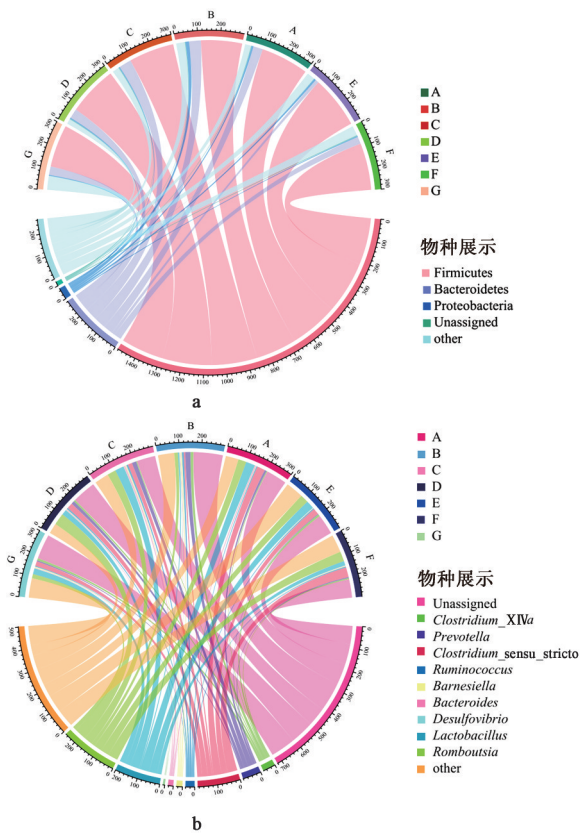
Fig. 3 Shannon index analysis of intestinal flora of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

**3.5.4 肠道菌群 Beta 多样性变化** 由主成分分析 (PCA) 结果可知,各组样品距离明显分散无重合,与

空白组比较,模型组样本距离聚类发生了一定的偏移;与模型组比较,各给药组样本均有向空白组回归的趋势。主成分 1 和 2 分别可以解释组间 22.85%、12.12% 的差异,见增强出版附加材料。说明造模及给药处理均对大鼠肠道菌群结构产生了一定影响,补肺汤对 COPD 肺气虚证大鼠肠道菌群 Beta 多样性具有干预作用。

**3.5.5 肠道菌群结构分析** 物种组成分析显示,在门水平上,厚壁菌门(Firmicutes)在各组中的相对丰度排序依次为补肺汤低剂量组(79.43%)、地塞米松组(75.20%)、空白组(72.60%)、补肺汤中剂量组(71.33%)、FMT 组(68.77%)、补肺汤高剂量组(64.50%)、模型组(62.47%);拟杆菌门(Bacteroidetes)在各组中的相对丰度排序依次为 FMT 组(18.63%)、模型组(17.87%)、地塞米松组(14.47%)、空白组(14.43%)、补肺汤高剂量组(12.76%)、补肺汤中剂量组(10.87%)、补肺汤低剂量组(5.05%);变形菌门(Proteobacteria)在各组中的相对丰度排序依次为模型组(5.39%)、补肺汤低剂量组(2.92%)、空白组(2.66%)、地塞米松组(1.69%)、补肺汤中剂量组(1.52%)、FMT 组(1.44%)、补肺汤高剂量组(1.30%);见图 4a。在属水平上,普雷沃氏菌属(*Prevotella*)在各组中的相对丰度排序依次为模型组(8.00%)、FMT 组(6.71%)、地塞米松组(4.87%)、空白组(3.19%)、补肺汤高剂量组(1.69%)、补肺汤中剂量组(1.48%)、补肺汤低剂量组(1.00%);巴恩斯氏菌属(*Barnesiella*)在各组中的相对丰度排序依次为模型组(2.44%)、FMT 组(2.00%)、补肺汤高剂量组(1.68%)、补肺汤中剂量组(0.99%)、地塞米松组(0.66%)、空白组(0.66%)、补肺汤低剂量组(0.46%);乳杆菌属(*Lactobacillus*)在各组中的相对丰度排序依次为空白组(14.16%)、FMT 组(13.84%)、补肺汤低剂量组(12.64%)、补肺汤高剂量组(9.09%)、地塞米松组(8.26%)、补肺汤中剂量组(6.89%)、模型组(2.00%);见图 4b。

LEfSe 分析发现,在门水平上,与空白组比较,模型组表现出螺旋体门(Spirochaetes)丰度增加,厚壁菌门丰度减少。与模型组比较,FMT 组、地塞米松组及补肺汤高、中、低剂量组变形菌门、Candidatus\_Saccharibacteria 丰度均有不同程度减少;除补肺汤高剂量组外,其余各干预组厚壁菌门丰度增加;补肺汤不同剂量组拟杆菌门丰度减少。在属水平上,与空白组比较,模型组普雷沃氏菌属、厌氧螺菌属(*Anaerobiospirillum*)、梭状芽孢杆菌属



注:a.门水平物种丰度;b.属水平物种丰度

图4 各组大鼠肠道菌群在不同分类水平的相对丰度

Fig. 4 Relative abundance of intestinal flora of rats in each group at different taxonomic levels

(*Clostridium*)\_XIVa、密螺旋体属(*Treponema*)、优杆菌属(*Eubacterium*)、肠单胞球菌属(*Intestinimonas*)丰度增多,拟杆菌属(*Bacteroides*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、*Clostridium\_sensu\_stricto*、罗姆布茨菌属(*Romboutsia*)、苏黎世杆菌属(*Turicibacter*)丰度减少。与模型组比较,FMT组、地塞米松组和补肺汤各剂量组均表现出厌氧螺旋菌属、*Clostridium\_XIVa*、*Clostridium\_sensu\_stricto*和*Saccharibacteria\_genera\_incertae\_sedis*丰度减少,苏黎世杆菌属丰度增加;FMT组普雷沃氏菌属丰度减少,乳杆菌属、拟杆菌属、罗姆布茨菌属丰度增加;地塞米松组优杆菌属、肠单胞球菌属、巴恩斯氏菌属丰度减少,罗姆布茨菌属、拟杆菌属丰度增加;补肺汤低剂量组优杆菌属、拟杆菌属、阿克曼氏菌属(*Akkermansia*)、巴恩斯氏菌属、普雷沃氏菌属丰度减少,罗姆布茨菌属丰度增加;补肺汤中剂量组拟杆菌属、肠单胞球菌属、优杆菌属、普雷沃氏菌属丰度减少,乳杆菌属、罗姆布茨菌属丰度增加;补肺汤高剂量组肠单胞球菌属、拟杆菌属、普雷沃氏菌属丰度减少;乳杆菌属丰度增加。各组大鼠肠道菌群

组间差异显著物种筛选的LEfSe分析见增强出版附加材料。

**3.6 功能预测** 为了确定肠道微生物区系的分类变化是否对其功能造成影响,通过PICRUSt2对OUT进行MetaCyc肠道菌群功能预测,见增强出版附加材料。与空白组比较,模型组大鼠共有16种差异代谢通路,其中涉及核苷酸代谢通路PWY-6609(腺嘌呤和腺苷抢救III)、PWY-6126(腺苷核苷酸从头生物合成的超通路II)、PWY-7222(鸟苷脱氧核糖核苷酸从头生物合成II)、PWY-7220(腺苷脱氧核糖核苷酸从头生物合成II)和脂质代谢通路PHOSLIPSYN-PWY[磷脂生物合成的超通路I(细菌)]、PWY0-1319[胞苷二磷酸(CDP)-二酰基甘油生物合成II]、PWY-5667(CDP-二酰基甘油生物合成I)功能下调;而核苷酸代谢通路PWY-5686[尿苷单磷酸(UMP)生物合成I]、PWY-7219(腺苷核糖核苷酸从头生物合成)、氨基酸代谢通路PWY-5101(L-异亮氨酸生物合成II)、VALSYN-PWY(L-缬氨酸生物合成)、ILEUSYN-PWY[L-异亮氨酸生物合成I(来自苏氨酸)]、PWY-5104(L-异亮氨酸生物合成IV)、碳水化合物代谢通路CALVIN-PWY(还原型戊糖磷酸循环)、PWY-7111[丙酮酸发酵成异丁(工程化)]功能上调。与模型组比较,FMT组表现出5种核苷酸、3种脂质和1种碳水化合物代谢通路功能上调,4种氨基酸、2种碳水化合物代谢通路功能下调;地塞米松组表现出4种核苷酸代谢通路功能上调,4种氨基酸、1种碳水化合物代谢通路功能下调;补肺汤低剂量组2种碳水化合物代谢通路功能下调;补肺汤中剂量组表现出5种核苷酸、3种脂质、2种碳水化合物代谢通路功能上调,4种氨基酸、3种碳水化合物、2种核苷酸代谢途径功能下调;补肺汤高剂量组表现出2种脂质、2种核苷酸代谢途径功能上调,3种氨基酸、2种碳水化合物代谢途径功能下调。FMT组、地塞米松组和补肺汤各剂量组均出现还原型戊糖磷酸循环途径功能下调,且补肺汤各剂量组均出现NONOXIPENT-PWY[磷酸戊糖途径(非氧化分支)I]和还原型戊糖磷酸循环途径功能下调。

#### 4 讨论

肠道菌群被认为是宿主另一个必要“器官”,与宿主形成共代谢系统,参与宿主的营养、代谢、排泄和代谢物转化等过程,维持肠黏膜屏障的完整性,并通过连接器官参与宿主的生命活动<sup>[18]</sup>。由微生物和免疫细胞介导的肺和肠组织之间的相互作用

网络,即为肺-肠轴,肠道菌群可与免疫系统相互作用,介导肠道和肺的免疫功能,免疫细胞通过淋巴系统和血液循环影响局部乃至全身免疫稳态<sup>[19]</sup>。据报道,COPD模型大鼠外周LPS水平升高,同时伴随着肠道菌群丰度和多样性改变,可能影响结肠菌群代谢产物的水平,从而诱导肠道微生物转移和易位,增加COPD致病菌感染和相关炎症介质产生的风险<sup>[20-21]</sup>。而肺部遭受严重感染时,外周循环的高水平促炎因子将扰乱肠道菌群并破坏肠道完整性,导致肠道局部炎症增加,以及“肠漏”的发生,使细菌和毒素又通过肺-肠轴之间的串扰加重肺部感染,造成恶性循环<sup>[22]</sup>。如TNF- $\alpha$ 、IL-8与COPD的慢性炎症程度密切相关,这些炎症介质将加重肺部炎症细胞浸润,破坏肺组织结构<sup>[23]</sup>。

本文研究结果显示,模型组大鼠肺组织出现严重病变,同时结肠组织结构完整性也遭到破坏,肺组织TNF- $\alpha$ 、IL-8含量显著升高;补肺汤各剂量组干预后能有效改善肺、结肠组织形态,降低炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-8在肺组织中的含量,减轻炎症反应所引发的肺组织损伤,表明补肺汤能有效改善COPD肺气虚证大鼠的肺、结肠组织形态,减轻肺组织炎症反应;而FMT组大鼠肺组织TNF- $\alpha$ 、IL-8含量较模型组升高,肺组织病变程度却较轻,可能是由于本研究仅采用粗提取的方法制备粪菌液,未对其中更微小的杂质或有害微生物进行处理,导致激发肺组织TNF- $\alpha$ 、IL-8水平上升;而COPD肺组织损伤受多种作用机制影响<sup>[24]</sup>,加之肠道细菌种群组成复杂且与COPD之间相关联的作用靶点较多<sup>[25-26]</sup>,故FMT帮助恢复模型大鼠肠道菌群平衡修复肺组织损伤的潜在靶点仍有待深入挖掘。

基于16S rRNA测序的肠道菌群研究多采用OUT聚类、Alpha多样性、Beta多样性和代谢功能等指标进行分析。有研究指出COPD患者肠道菌群的Alpha、Beta多样性与健康人群之间具有显著差异,并以此推测肠道菌群结构的改变与COPD预后不良之间的关系<sup>[27]</sup>;其中Alpha多样性指数的不稳定性与COPD患者肺功能下降之间存在潜在关联并影响COPD的进展<sup>[28]</sup>。本文研究结果表明,与空白组比较,模型组肠道菌群OTU总数下降,并综合Alpha多样性Shannon指数和Beta多样性PCA可知,模型组物种多样性及丰度均发生了明显偏移,补肺汤高、中、低剂量组肠道菌群物种丰富度指数与多样性指数较模型组均有不同程度改善。在代谢功能方面,BOWERMAN等<sup>[29]</sup>研究发现COPD患者的特

征性代谢物概况主要涉及脂质、氨基酸和异种微生物的相关代谢物。本研究则发现COPD肺气虚证模型大鼠主要涉及核苷酸、碳水化合物、氨基酸和脂质代谢通路的差异变化,补肺汤主要针对碳水化合物代谢通路磷酸戊糖途径(非氧化分支)I和还原型戊糖磷酸循环途径功能发挥下调作用。综上分析,补肺汤对COPD肺气虚证的肠道菌群具有整体调节作用,推断其可能是由于中药复方具有多靶点、多途径干预的特性,帮助机体恢复肠道菌群平衡<sup>[30-31]</sup>,但其作用机制仍需进一步探索。

据报道,有80%~90%的COPD患者有吸烟史,香烟烟雾的长期刺激是公认导致COPD的主要原因<sup>[32]</sup>。运用分类学组成和聚类学分析发现,与从不吸烟的人群相比,当前吸烟者肠道菌群的拟杆菌门比例显著增加,而厚壁菌门的比例则显著降低<sup>[33]</sup>。本研究制备的COPD肺气虚证大鼠模型基本符合吸烟者肠道细菌门类的变化,模型组大鼠表现为厚壁菌门的丰度减少和拟杆菌门、变形菌门和螺旋体门的丰度增加。补肺汤主要针对肠道菌群4种细菌门进行调节,其中包括减少拟杆菌门、变形菌门和Candidatus\_Saccharibacteria的相对丰度,增加厚壁菌门的相对丰度;厚壁菌门作为肠道中占比最大的优势菌群,参与宿主能量物质的合成代谢<sup>[34]</sup>,补肺汤通过增加模型大鼠厚壁菌门丰度,对于调节肠道菌群稳态和保护肠道健康,维持正常生理机能发挥重要作用。同时调节13种细菌属,包括增加苏黎世杆菌属和乳杆菌属等有益菌属的丰度,以及减少厌氧螺菌属、Clostridium、肠单胞球菌属等有害细菌属的丰度;其中苏黎世杆菌属-宿主之间的生理机制刚逐步被认知。

苏黎世杆菌属是肠道菌群的重要成员,在葡聚糖硫酸钠诱导的肠道炎症中发现数量减少<sup>[35]</sup>,且与高多酚含量食物诱导的淋巴细胞免疫功能调节呈正相关<sup>[36]</sup>。早产巴马猪模型在接受益生菌干预后可帮助机体生长发育和肺泡化进程,可能是益生菌通过促进回肠绒毛发育和改变肠道菌群结构,从而促进机体生长发育和肺泡化进程,其益生菌干预组的回肠优势菌属均为苏黎世杆菌属<sup>[37]</sup>,故推测该属可能是影响肺-肠轴健康状态的关键靶细菌属。已有报道报道化浊解毒方<sup>[38]</sup>和灵芝孢子油<sup>[39]</sup>等可增强机体免疫活性及抗炎能力,进而发挥治疗作用,这与其提升苏黎世杆菌属的相对丰度密切相关。本文研究显示,与模型组比较,FMT组、地塞米松组和补肺汤各剂量组均表现出了苏黎世杆菌属相对

丰度增加。因此,补肺汤对 COPD 肺气虚证大鼠的肠道菌群紊乱具有正向调节作用,使细菌物种结构及多样性趋向正常状态,这可能与其通过增加以苏黎世杆菌属为代表的优势细菌属而恢复肺-肠轴平衡,减轻 COPD 肺、肠组织的慢性炎症反应有关。

综上所述, COPD 肺气虚证大鼠出现肠道菌群紊乱、炎性因子水平升高、肺和结肠组织结构遭到破坏,基本符合肺-肠轴理论,部分揭示了 COPD 肺肠同病的现代医学内涵。尽管本实验初步验证了补肺汤能纠正 COPD 肺气虚证的肠道菌群紊乱,调节与炎症相关的肠道菌群,抑制肺及肠道组织的炎症反应,修复组织损伤,达到恢复肺-肠轴平衡状态、发挥肺肠同治作用干预 COPD 的目的,但现阶段对于补肺汤药效物质基础研究还不够完善,加之肠道菌群组成十分庞杂,其与疾病间的关系及中药对其调控机制仍有待进一步探讨。因此,后续将考虑通过构建单一菌种的介入性试验,探索影响 COPD 的关键肠道细菌种属及其作用机制,为 COPD 的临床防治提供参考。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] FANG L W, GAO P, BAO H L, et al. Chronic obstructive pulmonary disease in China: A nationwide prevalence study[J]. *Lancet Respir Med*, 2018, 6(6): 421-430.

[2] ZHONG N S, WANG C, YAO W Z, et al. Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease in China: A large, population-based survey [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 176(8): 753-760.

[3] YANG T, CAI B Q, CAO B, et al. Severity distribution and treatment of chronic obstructive pulmonary disease in China: Baseline results of an observational study[J]. *Respir Res*, 2022, 23(1): 106.

[4] BURKE H, WILKINSON T M A. Unravelling the mechanisms driving multimorbidity in COPD to develop holistic approaches to patient-centred care[J]. *Eur Respir Rev*, 2021, 30(160): 210041.

[5] 李叶卉,朱文,周贤梅. 血必净注射液对慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者炎症指标及免疫功能影响的 Meta 分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(8): 188-195.

[6] 滕俊,柴欣楼,王琦,等. COPD 肠道功能障碍及中医治法[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(2): 196-202.

[7] 张珊珊,马微芬. 老年慢性阻塞性肺病患者肺部感

染病原菌与肠道定植菌的关系[J]. *中国微生态学杂志*, 2021, 33(4): 432-435.

- [8] ZHANG D P, LI S, WANG N, et al. The cross-talk between gut microbiota and lungs in common lung diseases[J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 301.
- [9] 李仲南. 永类铃方: 卷十六[M]. 王均宁,整理. 北京:人民卫生出版社,2006:645-646.
- [10] 罗伟贤,李伟珂,王至婉. 慢性阻塞性肺疾病证候诊断的内涵与外延[J]. *中医学报*, 2021, 36(4): 687-690.
- [11] 姚诗清,周兰,孙涛,等. 补肺汤合参蛤散辨治联合伏九贴敷对稳定期 COPD 肺肾气虚证患者的防治[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(7): 92-97.
- [12] 陈晓英,刘绍海,喻甫斌. 补肺汤内服配合呼吸肌锻炼治疗慢阻肺缓解期肺气虚型临床观察[J]. *实用中医药杂志*, 2019, 35(4): 403-404.
- [13] 师为人,褚璨灿,陈雅婷,等. 王氏连朴饮对急性肺损伤大鼠血清肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、白细胞介素 $1\beta$ 的影响[J]. *中医杂志*, 2018, 59(21): 1868-1872.
- [14] 刘杨,朱星,徐昌君,等. 补肺汤对肺纤维化小鼠肺组织中自噬相关蛋白的影响[J]. *中药材*, 2017, 40(1): 192-197.
- [15] 刘炜,骆新,沈静. 补肺汤通过 TGF- $\beta$ /Smad3 信号通路抑制小鼠肺纤维化的研究[J]. *医药导报*, 2020, 39(6): 747-752.
- [16] LIU T H, YANG Z S, ZHANG X M, et al. 16S rDNA analysis of the effect of fecal microbiota transplantation on pulmonary and intestinal flora[J]. *3 Biotech*, 2017, 7(6): 370.
- [17] 王成阳,李泽庚. 六味补气胶囊对 COPD 肺气虚证大鼠 JAK/STAT 通路、MMPs/TIMP 的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(5): 1384-1390.
- [18] WANG X Q, ZHANG A H, MIAO J H, et al. Gut microbiota as important modulator of metabolism in health and disease[J]. *RSC Adv*, 2018, 8(74): 42380-42389.
- [19] XU L, HO C T, LIU Y N, et al. Potential application of tea polyphenols to the prevention of COVID-19 infection: Based on the gut-lung axis[J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 899842.
- [20] LI N J, YANG Z W, LIAO B L, et al. Chronic exposure to ambient particulate matter induces gut microbial dysbiosis in a rat COPD model[J]. *Respir Res*, 2020, 21(1): 271.
- [21] LI C X, LIU H Y, LIN Y X, et al. The gut microbiota and respiratory diseases: New evidence[J]. *J Immunol Res*, 2020, 2020: 2340670.
- [22] AKYAS B, ASLIM B. Gut-lung axis and dysbiosis in

- COVID-19[J]. *Turk J Biol*, 2020, 44(3):265-272.
- [23] CHEN Z Y, LIN Y M, WU J H, et al. Effect of doxofylline on pulmonary inflammatory response and oxidative stress during mechanical ventilation in rats with COPD[J]. *BMC Pulm Med*, 2022, 22(1):66.
- [24] BRASSINGTON K, SELEMIDIS S, BOZINOVSKI S, et al. Chronic obstructive pulmonary disease and atherosclerosis: Common mechanisms and novel therapeutics [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2022, 136(6):405-423.
- [25] SHI C Y, YU C H, YU W Y, et al. Gut-lung microbiota in chronic pulmonary diseases: Evolution, pathogenesis, and therapeutics [J]. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 2021, 2021:9278441.
- [26] KOTLYAROV S. Role of short-chain fatty acids produced by gut microbiota in innate lung immunity and pathogenesis of the heterogeneous course of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(9):4768.
- [27] WANG Y A, LI N, LI Q Y, et al. Xuanbai Chengqi decoction ameliorates pulmonary inflammation via reshaping gut microbiota and rectifying Th17/Treg imbalance in a murine model of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2021, 16:3317-3335.
- [28] CHIU Y C, LEE S W, LIU C W, et al. Relationship between gut microbiota and lung function decline in patients with chronic obstructive pulmonary disease: A 1-year follow-up study [J]. *Respir Res*, 2022, 23(1):10.
- [29] BOWERMAN K L, REHMAN S F, VAUGHAN A, et al. Disease-associated gut microbiome and metabolome changes in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):5886.
- [30] 张美玉, 吴泳锡, 王一竹, 等. 补气中药通过调节肠道菌群治疗脾虚证的研究进展[J]. *中草药*, 2021, 52(17):5430-5436.
- [31] 刘璇, 张治国, 魏娟, 等. 痰热清注射液对慢性阻塞性肺病急性加重期痰热壅肺证患者肠道微生物多样性的影响[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2018, 24(10):1428-1431.
- [32] ZENG F Y, HONG W, ZHA R J, et al. Smoking related attention alteration in chronic obstructive pulmonary disease-smoking comorbidity [J]. *BMC Pulm Med*, 2022, 22(1):182.
- [33] LEE S H, YUN Y, KIM S J, et al. Association between cigarette smoking status and composition of gut microbiota: Population-based cross-sectional study [J]. *J Clin Med*, 2018, 7(9):282.
- [34] LI G X, YIN P, CHU S H, et al. Correlation analysis between GDM and gut microbial composition in late pregnancy [J]. *J Diabetes Res*, 2021, 2021:8892849.
- [35] NAGALINGAM N A, KAO J Y, YOUNG V B. Microbial ecology of the murine gut associated with the development of dextran sodium sulfate-induced colitis [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2011, 17(4):917-926.
- [36] CAMPS-BOSSACOMA M, MASSOT-CLADERA M, ABRIL-GIL M, et al. Cocoa diet and antibody immune response in preclinical studies [J]. *Front Nutr*, 2017, 4:28.
- [37] 谢亮, 杨森, 周丹, 等. 益生菌对早产巴马猪生后肺发育的影响[J]. *中华儿科杂志*, 2022, 60(4):297-301.
- [38] ZHOU P P, YANG T X, XU M C, et al. 16S rRNA sequencing-based evaluation of the protective effects of Hua-Zhuo-Jie-Du on rats with chronic atrophic gastritis [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2022, 22(1):71.
- [39] WU X, CAO J L, LI M X, et al. An integrated microbiome and metabolomic analysis identifies immunoenhancing features of *Ganoderma lucidum* spores oil in mice [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 158:104937.

[责任编辑 刘德文]