

· 实验研究 ·

从肺肠微生态变化研究肺与大肠的相关性

郑旭锐 杨宇* 郑秀丽 周新颖 雍俊 刘旺华

(成都中医药大学基础医学院, 四川省成都市十二桥路37号, 610075)

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)资助项目(2009CB522706)

* 通讯作者: yang6666yu@163.com, (028)87710818

[摘要] 目的 从微生态角度探索“肺与大肠相表里”的机制。方法 将40只Wistar大鼠随机分为空白对照组、肺病组(过敏性哮喘)、肠病组(便秘)和肺肠同病组(过敏性哮喘合便秘), 每组10只, 收集各组大鼠的支气管肺泡灌洗液和粪便样本, 进行肺部和肠道菌群主要微生物种类与含量检测。结果 与空白对照组比较, 肺病组、肺肠同病组大鼠的肺部菌群及3组大鼠的肠道菌群差异均有统计学意义($P < 0.01$); 肠病组大鼠的肺部菌群与肺病组差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 肺肠同病组大鼠肺部菌群与肺病组比较差异有统计学意义($P < 0.01$), 且肠道菌群与肠病组比较差异亦有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 肺病状态下可导致肠道菌群变化, 肠病也可影响肺部菌群的变化, 为“肺与大肠相表里”提供部分微生态学实验依据。

[关键词] 肺与大肠相表里; 菌群; 微生态; 哮喘; 便秘

Correlation between the Lung and Large Intestine from the Micro-ecological Changes of Lung and Intestinal Flora

ZHENG Xurui, YANG Yu, ZHENG Xiuli, ZHOU Xinying, DING Weijun, LIU Wanhua

(College of Predinical Medicine, Chengdu University of Chinese Medicine, Chengdu 610075)

ABSTRACT Objective To explore the mechanism of the “exterior-interior relation between lung and large intestine” from the micro-ecology. **Methods** Forty Wistar rats were randomized in blank control group, lung disease group (allergic asthma), bowel disease group (constipation), and lung-intestine disease group (allergic asthma and constipation), with 10 in each. The bronchoalveolar lavage fluid and fecal samples of all rats were collected for determining the main microbial types and contents of lung and intestinal flora and analyzing the basic features of micro-ecological condition in the lung disease, bowel disease, and lung-intestine disease. **Results** Compared with the blank control group, lung flora of the lung disease group and lung-intestine disease group were significantly different ($P < 0.01$), the intestinal flora of all the three group showed a significant difference ($P < 0.01$); the lung flora of the bowel disease group presented a significant difference ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) compared with that of lung disease group. Under the condition of lung and intestine being both diseased, the lung flora of rats was significantly different in comparing with that of lung disease group ($P < 0.01$), and the intestinal flora was also significantly different in comparing with that of bowel disease group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The lung disease may cause the changes in intestinal flora, and the bowel disease may also affect the changes in lung flora. It provides some experimental bases from micro-ecology for the “exterior-interior relation between lung and large intestine”.

Key Words exterior-interior relation between lung and large intestine; flora; micro-ecology; asthma; constipation

“肺与大肠相表里”是脏腑相关理论的代表之一,其机制有待深入研究。课题组前期研究结果显示,肺与大肠在黏膜免疫和神经肽方面存在一定的相关性,部分揭示了“肺”与“大肠”相关的机制^[1]。为了进一步拓展对“肺”与“大肠”生理病理关联的机制,本实验从微生态学角度出发,通过观察肺部和肠道的菌群生长状况,探寻“肺与大肠相表里”在微生态方面相互影响的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

Wistar大鼠 40只, SPF级, 雄性, 体重(180±20)g 购自成都达硕生物科技有限公司, 实验动物许可证号: SCXK(川)2008-15

1.2 药物及试剂

1% 卵白蛋白(OVA, Sigma产品), 氢氧化铝(批号: 20080807, 成都市科龙化工试剂厂), 复方地芬诺

酯片(批号: 09033001,焦作市博爱药业有限公司)

1.3 主要仪器及设备

超声雾化器(WH-203型),厌氧培养箱(DY-II型),隔水式需氧培养箱(SA-25型)。

1.4 分组及模型制备

采用随机数字表法将40只大鼠分为4组:空白对照组、肺病组(过敏性哮喘模型组)、肠病组(便秘模型组)和肺肠同病组(过敏性哮喘合便秘模型组),每组10只。

肺病组模型制备及判定标准依据文献[2],将OVA 1mg和氢氧化铝200mg溶于生理盐水1ml中配制成凝胶致敏剂,第1天和第7天在大鼠双侧胸部、腹股沟共取4点各皮下注射0.15ml该致敏剂,同时腹腔注射0.4ml共计1ml进行致敏。14天开始将大鼠置于有机玻璃盒内,超声雾化吸入1%OVA诱发哮喘(以大鼠出现烦躁、喷嚏、咳嗽、腹肌强烈收缩、呼吸急促等典型哮喘样发作为标准),每天1次,每次30min,共计1周。

肠病组模型制备根据文献[3-4]方法进行改进,将大鼠给予复方地芬诺酯片灌胃,剂量10mg/kg,隔天灌胃1次以保持大鼠持续的便秘状态。造模后根据大鼠粪便的情况判断模型是否成功,以粪便干燥粒形缩短、排出费力、日排出量低于正常参考值范围(4.28~11.18g)为诊断大鼠便秘的标准^[5]。

肺肠同病组的制备,灌胃给予复方地芬诺片和注射致敏剂,具体方法同肺病组和肠病组。

1.5 标本采集与培养

最后1次雾化吸入次日的上午按摩大鼠腹部促进排便,将粪便置于灭菌研瓶内捣碎,然后用无菌生理盐水(0.85%)作对数稀释。

支气管肺泡灌洗液的收集:10%水合氯醛麻醉大鼠,暴露气管,插管,用0.02% PBS灌洗肺脏5~6次,收集灌洗液,以1500r/min离心5min,保存备用。用稀释液对样本行10倍系列稀释成不同稀释度(10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6})的细菌标本液备用。

真菌的培养:移液器分别取0.1~0.2ml的已稀释10倍的稀释液涂抹于真菌培养基(沙堡弱培养基)表面,28℃培养3~5天观察结果。

细菌的培养:移液器吸取不同稀释度的细菌样本稀释液各20μl,滴于相应选择性培养基表面。每个稀释度作3个平行样,将已接种好的培养皿分别放入37℃需氧和厌氧培养箱中培养24~72h,严格无菌操作,确保无交叉污染。

1.6 菌落计数与种类鉴定

菌落计数:计数培养皿表面的菌落数并乘以稀释倍数,得到菌落形成单位(CFU)数据。由于数据较大,将此原始数据转换成对数值,完成统计运算。

种类鉴定:根据细菌形态学、菌落、菌细胞和菌落形态、染色性及生化实验鉴定。

1.7 统计学方法

采用SPSS 16.0统计软件进行分析,计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠肺部微生态检测结果

表1示,肺病组和肺肠同病组大鼠的菌群与空白对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);肠病组大鼠菌群中的厌氧菌和真菌与空白对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);肺肠同病组大鼠的菌群与肺病组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),与肠病组比较差异亦有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);肺病组与肠病组各菌群比较差异亦有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.2 各组大鼠肠道微生态检测结果

表2示,3组大鼠的菌群与空白对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$);肺肠同病组大鼠的菌群与肺病组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而与肠病组比较,除需氧菌外,其他菌群差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);肺病组与肠病组大鼠在需氧菌和厌氧菌方面差异亦有统计学意义($P < 0.05$)。

表1 各组大鼠肺部需氧菌、厌氧菌、真菌检测结果比较(CFU/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	需氧菌	厌氧菌	真菌
空白对照组	10	6.85±0.87	7.75±0.41	9.29±0.62
肺病组	10	10.84±1.94 ^{△★★}	6.73±0.45 ^{△★★}	11.69±0.93 ^{△★}
肠病组	10	8.03±0.56	7.29±0.31 [△]	10.72±0.72 [△]
肺肠同病组	10	13.28±2.11 ^{△★★★}	6.16±0.43 ^{△★★★}	13.15±1.07 ^{△★★★}

注:与空白对照组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$;与肺病组比较,▲ $P < 0.01$;与肠病组比较,★ $P < 0.05$,★★ $P < 0.01$
(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

表 2 各组大鼠肠道需氧菌、厌氧菌、真菌、大肠杆菌、类杆菌、双歧杆菌检测结果比较 (CFU/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	需氧菌	厌氧菌	真菌	大肠杆菌	类杆菌	双歧杆菌
空白对照组	10	8.26±0.42	9.26±0.33	2.59±0.40	7.44±0.48	9.23±0.52	9.69±0.68
肺病组	10	10.59±0.81 [★]	7.25±0.27 [★]	4.38±0.42 [△]	8.45±0.29 [△]	8.11±0.29 [△]	8.08±0.25 [△]
肠病组	10	11.14±0.86 [△]	6.90±0.39 [△]	4.73±0.30 [△]	8.74±1.15 [△]	7.69±0.53 [△]	7.62±0.54 [△]
肺肠同病组	10	12.14±0.79 ^{△▲▲}	6.47±0.38 ^{△▲▲}	5.21±0.57 ^{△▲▲}	9.49±0.33 ^{△▲}	7.14±0.39 ^{△▲▲}	6.99±0.51 ^{△▲▲}

注:与空白对照组比较,△*P* < 0. 01;与肺病组比较,▲*P* < 0. 05,▲▲*P* < 0. 01;与肠病组比较,★*P* < 0. 05,★★*P* < 0. 01

3 讨论

正常状况下,机体与正常菌群之间保持着动态的微生物平衡,常驻菌与宿主的微环境形成一个相互依赖又相互作用的微生态系统。一旦这种微生物平衡受到破坏,就有可能导致机体疾病的发生^[8]。

本次实验结果显示,在肺病状态和肠病状态下,大鼠的肠道菌群变化与正常状态比较差异均有统计学意义(*P* < 0. 01)。而在肠病状态下,大鼠的肺部菌群变化与肺病状态比较,差异亦有统计学意义(*P* < 0. 05或*P* < 0. 01),说明肠病和肺病均对肺具有一定影响,但以肺病对肠的影响大。肺肠同病状态下,大鼠的肺部菌群和肠道菌群变化均较单纯的肺病和肠病显著。由此可以看出脏腑间相互影响的程度具有一定的差异,脏病对腑的影响比较明显,程度较大,而腑病对脏虽有一定影响,但相对较小。脏腑同病时,脏腑均发生明显变化,比单纯脏病或单纯腑病更为严重。

可见,在肺与肠道病理状态下,以及肺肠同病状态下的菌群变化,在一定程度上似能为“肺与大肠相表里”的机制研究提供微生物学方面的实验依据。肺

病可影响肠道菌群的变化,肠病也可反过来影响肺部菌群的变化,肺肠同病则对肺部和肠道菌群均有显著影响。本研究从微生物学角度为“肺与大肠相表里”的机制进行了探索,在今后的研究中将进一步为肺肠相关性的微生物研究提供实验依据。

参考文献

[1] 靳文学,杨宇.从粘膜免疫看“肺与大肠相表里”[J].四川中医,2005,23(12):1-3.
[2] 陆宁飞,卞涛,陈力,等.支气管哮喘大鼠模型的建立与气道反应性的测定[J].南京医科大学学报(自然科学版),2006,11(11):1018-1021.
[3] 万锦洲,马锦星,刘卉.一种简易的小鼠便秘模型[J].中国药理学通报,1994,10(1):71-72.
[4] 高洋,温志军,杨波,等.针刺对便秘大鼠模型排便功能的影响[J].长春中医药大学学报,2008,24(3):246-247.
[5] 王朝晖,赵延红,肖美芳,等.大鼠便秘模型制作的初步实验研究[J].现代中医药,2004,(3):53-54.
[6] 陈海龙.肠道屏障功能障碍[M]./李永渝.实用消化病生理学.上海:同济大学出版社,2003:52-65.

(收稿日期:2010-05-21;修回日期:2011-02-01)

[编辑:行之]

中医杂志社医海林音像书店邮购图书目录

●《李时珍医学全书》包括《本草纲目》《濒湖脉学》《奇经八脉考》和《脉诀考》4种。现集成一册点校,用简体字横排方式出版。每册192.00元。
●《证治准绳》为明代著名医家王肯堂所撰。全书包括《杂病》八卷、《类方》八卷、《伤寒》八卷、《疡医》六卷、《幼科》九卷、《妇科》五卷,共计种、四十四卷。其中《杂病》与《类方》两种内容相关,前者专论杂病证治,后者专载所用方药,二者实为姊妹篇。其余四种均独立成篇,分述了伤寒及外、妇、儿科疾病的脉因证治。由于该书详论各科证治,条分缕析;博采众家所长,平正公允。故本书自问世以来,颇为历代医家所推崇,是一部中医临床治疗的重要著作。每册:208.00元。
●《医学纲目》本书系明代医家楼英之代表作。全书共40卷,汇集明以前中医学术之大成,并结合个人见解分论论述,纲目清晰,资料丰富,内容包括阴阳脏腑、运气气候、各科病证诊治、针灸及调摄等。其特点是每论一证,先引历代有关论述,治法区分为正门与支门,取各家之长,体现同病异治的原则。是一部颇具法度的中医类图书。每册:98.50元。
●《黄元御医学全书》清·黄元御撰,包括《素问悬解》《灵枢悬解》《难经悬解》《伤寒悬解》《金匱悬解》《伤寒说意》《四圣悬枢》《素灵微蕴》《长沙药解》《玉楸药解》11种医著,均系《四库全书总目提要》所著录者。以上11种黄氏医籍均予全书点校,简体横排印刷。每册:103.00元。
●《千金方衍义》每册:70.00元。《千金要方》是唐代名医孙思邈的一部划时代医学巨著,为历代医家研究发掘医学的一个宝库。由于其博大深奥,绵历1300余年,对其注释阐发无一不取于问津。清代名医张璐凭藉60多年的临床体会,探研索研数十年,撰成《千金方衍义》一书,为历史上唯一的一部《千金要方》注释之书。
●《中医百年百名中医临床家丛书》是由卫生部原部长张文康担任主编,几百名中医专家进行整理而成。该套丛书收录了过去100年中为中医药事业做出过巨大贡献,在中医临床方面取得卓越成就,在全国享有崇高威望且具有较

高学术造诣的中医临床大家。以每位医独立成册,每册按医家小传、专病论治、诊余漫话、年谱四部分编写。本书不仅具有较高的临床参考价值和学术价值,同时还具有前所未有的文献价值。现出版的医家有:余无言、耿鉴庭、马光亚、赵心波、何炎燊、刘云鹏、单健民、张珍玉、李克绍、胡天雄、夏桂成、施今墨、董建华、于己百、李翰卿、郭士魁、叶心清、胡希恕、丁光迪、潘澄濂、颜德馨、徐志华、孟澍江、宋祚民、李斯炽。每套340.00元(免收邮资)。
●《中国民间疗法大全》汇集了临床各科近400余种常见病的民间疗法。本书介绍的方药易得,方法简便易行,为读者提供了切实可行的治疗方法,适合各级临床医生,特别是基层医务工作者。每册:56.00元。
●《国家职业保健技能社区实用全书》是介绍按摩疗法、足部按摩疗法、保健刮痧疗法、营养与饮食疗法、心理咨询疗法、养老护理疗法以及康复理疗等方法的基本手法、操作程序、适应范围和禁忌症,使这些与中医疗法相关的劳动技能,更加标准化和规范化。书中还针对常见的动脉硬化、高血压病、糖尿病、中风后遗症、慢性支气管炎、肿瘤恢复期等10种病症以及头痛、颈痛、腰腿痛、失眠、痛经等15种亚健康人群证候,从病因病机、临床表现以及综合的保健康复方法等方面,进行了详细的论述和说明,对每一种病症提供了多种治疗方案,容易操作和掌握。本书内容丰富,图文并茂,通俗易懂,体现了简单方便、价廉效验,操作性强的优点。邮购价:67元。
《医学入门》68.00《中国传统性学》56.00《百病食疗奇验大观》26.00;《实用疑难病中西医结合诊疗全书》68.00《金匱要略汤证论治》67.00;《万密斋医学全书》91.00;《当代中药外治临床大全》81.00。
以上书价均已含邮资,欲购者请汇款至北京东直门内南小街16号中医杂志医海林音像书店,邮编:100700 电话:(010)64035632。